



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

HÉLIA DE ALENCAR MARTINS

**TOXICIDADE CELULAR DE BEBIDAS LÁCTEAS ACHOCOLATADAS NÃO
FERMENTADAS**

PICOS, PIAUÍ

2016

HÉLIA DE ALENCAR MARTINS

**TOXICIDADE CELULAR DE BEBIDAS LÁCTEAS ACHOCOLATADAS NÃO
FERMENTADAS**

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

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

PICOS, PIAUÍ

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca José Albano de Macêdo

M386t Martins, Hélia de Alencar.

Toxidade celular de bebidas lácteas achocolatadas não fermentadas / Hélia de Alencar Martins.– 2016.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (32 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2017.

Orientador(A): Prof^a. Dra. Ana Paula Peron

1. Achocolatados Líquidos-Toxicidade Celular. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade. I. Título.

CDD 663.92

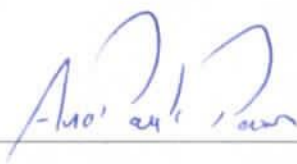
HÉLIA DE ALENCAR MARTINS

**TOXICIDADE CELULAR DE BEBIDAS LÁCTEAS ACHOCOLATADAS NÃO
FERMENTADAS**

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 26/07/2016

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Peron (Orientadora)

Curso de Ciências Biológicas – UFPI



Prof.Dr. Victor de Jesus Silva Meireles (Examinador)

Curso de Ciências Biológicas – UFPI



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

Curso de Ciências Biológicas – UFPI

Aos meus pais, e a toda a minha
família, que sempre me incentivaram
nunca desistir mesmo em meio ...
dificuldades.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me permitido chegar até aqui, e ter me dado forças para não desistir em meio as dificuldades enfrentadas durante o curso. Agradeço de forma especial aos meus pais Hélio Martins de Sousa e Antônia Alves de Alencar Martins, que sempre me apoiaram e me incentivaram a correr atrás de meus objetivos, e aos meus irmãos Noilza, Noélia e Isac que mesmo com a distância se fizeram presentes nos momentos em que recorri aos mesmo, e me apoiaram emocionalmente.

À prof. Dr. Ana Paula Peron, todo o meu respeito, carinho e gratidão, pelo apoio, pelo conhecimento e pela paciência, o meu muito obrigada, serei sempre grata e levarei comigo sempre, como exemplo a ser seguido e reproduzido (se possível).

De forma muito especial ao meu noivo Guilherme Feitoza, obrigada por me ajudar tanto nessa caminhada, por ter me mostrado o que realmente importa nessa vida. Às minha amigas e irmãs, companheiras de apartamento atualmente Emanuelle Rodrigues, Fernanda Ribeiro, Laryssa Holanda, e às que por lá já passaram e deixaram sua marca em meu coração, Anclébia Oliveira, Heloisa, Tâmara lúcia, Verônica, obrigada por cada momento, cada história e por cada memória que vocês me proporcionaram levar comigo, amo vocês.

Aos meu amigos e colegas da Biologia 2012.1, amo cada um, obrigada por terem se tornado tão especiais, levarei para sempre, obrigada pelo apoio, as risadas à minha dupla dinâmica Erick leal, e aos demais Francisco Antônio Luz, Ana Cleide, Natanael Silva, Juscelene, Leiciane Leal, Aldene Pereira, Italo Vinícius, Andréia, Larissa Jhenifer, Luanny cardoso, Mércia Moura, Savilly Sasahara, Gabrielle Meneses, Camila Fernanda, Brenda carvalho, Beatriz, Ana Jéssica, Rayllany Oliveira e Aline Rodrigues. O meu Muito obrigada! Vocês são todos muito especiais para mim.

As queridas do laboratório, que durante esse momento de aprendizagem tornaram os dias mais tranquilos e alegres, Ila Monize Sales e Fabelina Karollyne.

Aos meus queridos do CTI (Centro de Tecnologia da Informação), que me receberam todos os dias, Nonato Sales, Jonnison Lima, Pâmela Carvalho por todo apoio e companhia durante esses dias, o meu mais sincero muito obrigada. Aos mestres queridos, por todo o conhecimento, paciência, e compreensão. Enfim, aos todos que fizeram parte desta jornada, e desta etapa tão importante na minha vida, o meu muito Obrigada!

“A humildade é o sólido fundamento de todas as virtudes”.

(Confúcio)

RESUMO

Objetivou-se nesse trabalho avaliar a toxicidade celular induzida por bebidas lácteas achocolatadas provenientes de cinco empresas de expressiva influência no mercado de alimentos de países da América do Sul e Europa. Essa avaliação se deu por meio das células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L., nos tempos de exposição 24 e 48 horas, diretamente nos produtos lácteos comercializados. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que todas as amostras de achocolatados analisadas causaram expressiva redução do índice mitótico, logo no menor tempo de exposição considerado, e ocasionaram, nos dois tempos de análise estipulados, número estatisticamente significativo de alterações de fuso mitótico e micronúcleos aos meristema de raízes. Portanto, nas condições de análise estabelecidas, os achocolatados foram citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Tais resultados indicam que esses alimentos têm relevante potencial em causar distúrbios na proliferação celular e aberrações celulares e, dessa forma, necessitam ser avaliados mais detalhadamente em sistemas testes fisiologicamente mais complexo para que se possa estabelecer com propriedade a toxicidade em nível celular dessas bebidas, uma vez que são muito apreciadas pela população no mundo todo, com grande ênfase ao público infantil.

Palavras-chave: achocolatados líquidos, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, ciclo celular.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the acute toxicity at the cellular level of milk chocolate drinks, five companies of significant influence in the South American countries of food market and Europe. This assessment was through the meristem cells of roots of *Allium cepa* L., the exposure times 24 and 48 hours, directly in milk products marketed. Based on these results, it was found that all analyzed chocolate milk samples caused a significant reduction in mitotic index, at the lowest exposure time considered, and resulted in the two stipulated analysis times, statistically significant number of mitotic spindle changes and micronuclei to meristem evaluated roots. Therefore, the established analytical conditions, the chocolate milk were analyzed cytotoxic, genotoxic and mutagenic. These results indicate that these foods have significant potential to cause disturbances in cell proliferation and cell aberrations and therefore need to be assessed in more detail in systems testing more complex, as in mammals, so that we can establish ownership toxicity at the cellular level these drinks, since they are much appreciated by the people around the world

Keywords: liquid chocolate drinks, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, cell cycle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Achocolatados usados, e as cebolas utilizadas	22
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de células em cada fase do ciclo celular e de alterações celulares observados em tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com achocolatados pasteurizados, das empresas alimentícias A, B, C, D e E, avaliados nos tempos de exposição 24 e 48 horas.....24

Tabela 2 - Número e tipo de alterações encontradas em cada tempo de exposição das amostras.....25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACHOCOLATADOS	22
3.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM RAIZES DE ALLIUM CEPA	22
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

As bebidas lácteas achocolatadas do tipo não fermentadas são encontradas em todo o mundo e consumidas por pessoas de todas as idades. Tais produtos possuem em sua formulação básica constituintes nutricionais, como lactose, cálcio, magnésio e ferro e vitaminas como niacina, B1, B2, B6 e B12, considerados por profissionais da área de saúde como essenciais para o bom funcionamento do organismo (PFLANZER et al., 2010). Ainda, esses alimentos proporcionam conveniência e praticidade em seu consumo frente ao acelerado ritmo atual de vida da população, apresentam excelentes propriedades sensoriais, como cor, odor e sabor atrativos, e são comercializados em embalagens compactas, o que facilita sua estocagem (BATISTA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). No entanto, para a obtenção das características organolépticas oferecidas atualmente, a composição química original dos achocolatados lácteos não fermentados sofreu diversas alterações desde seu lançamento no mercado, no início da década de 90, dentre as quais a incorporação de classes de aditivos ou microingredientes alimentares sintéticos de ações edulcorantes, aromatizantes, corantes, acidulantes e espessantes (MIRTEN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

No Brasil, a confecção e comercialização de alimentos lácteos não fermentados é regida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Portaria Nº 36, de 31 de outubro de 2000, que aprova os regulamentos técnicos para fixação de padrões de identidade e qualidade de bebidas lácteas fermentadas e não fermentadas (BRASIL, 2000). O documento brasileiro foi construído com base nas determinações do *Codex Alimentarius*, principal órgão mundial responsável pelo estabelecimento das normas gerais de formulação química, segurança e rotulagem de alimentos (SILVA et al., 2015; PFLANZER et al., 2010). Contudo, há estudos que relacionam os microingredientes a efeitos prejudiciais à saúde de quem os consomem, com destaque ao público infantil. Entre as consequências descritas estão o desenvolvimento ou potencialização de alergias crônicas, distúrbios gastrointestinais e alterações no funcionamento do sistemas nervoso central (GOMES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; MOURA et al., 2016; SALES et al., 2016).

As agências de vigilância alimentar, como a *European Food Safety Authority* (EFSA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão de segurança alimentar brasileiro, ressaltam em seus regulamentos técnicos a necessidade constante de estudos citotoxicológicos de efeito agudo dos aditivos alimentares em geral, e, especialmente, dos alimentos

industrializados compostos por eles. Destacam também que os resultados obtidos destas análises são a base de elaboração ou modificação de estratégias das agências de segurança alimentar e, conseqüentemente, de atuação dos profissionais responsáveis pela vigilância alimentar e nutricional da população (BRASIL, 2007; MOURA et al., 2016; SALES et al., 2016). Entretanto, em uma ampla busca a literatura científica, verificou-se que não existem trabalhos de avaliação de toxicidade em nível celular de bebidas lácteas industrializadas, em geral.

A região meristemática de raízes de *Allium cepa* L. (cebola), é tida no meio científico como um eficiente bioensaio para a avaliação da toxicidade aguda em nível celular de compostos químicos em virtude de apresentarem número cromossômico reduzido ($2n=16$), o que facilita a detecção de alterações cromossômicas e de fuso mitótico (NEVES et al., 2014; BIANCHI et al., 2015). Esse sistema teste é aceito internacionalmente por agências de pesquisa como um instrumento de avaliação de importante sensibilidade para análise inicial da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de substância de interesse, uma vez que, os resultados obtidos por meio dele, em grande parte das vezes, demonstram similaridade satisfatória aos observados com sistemas testes animais e culturas de células (Tükoğlu, 2007; HERRERO et al., 2011; TABREZ et al., 2011; GOMES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; CAMPOS e MARIN-MORALES, 2016; LACERDA et al., 2014; SALES, 2014; MOURA et al., 2016; SANTANA et al., 2016; CAMPUS-VENTURA et al., 2016). Como exemplo pode-se citar os trabalhos realizados por Gomes et al. (2013) e Oliveira et al. (2016) que avaliaram em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* o potencial tóxico de corantes e aromatizantes sintéticos, respectivamente, utilizados na indústria de alimentos e obtiveram resultados semelhantes aos obtidos em sistemas testes animais e com culturas de células.

Conforme descrito por Zilifdar et al. (2014) e Valavanidis et al. (2013), substâncias citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas prejudicam mecanismos celulares vitais, como a duplicação e a transcrição gênica, alterando drasticamente a divisão celular de tecidos por meio de indução de aberrações celulares, como as de fuso mitótico e as quebras cromossômicas, condição que pode desencadear e/ou potencializar processos cancerosos. Segundo Zaineddin *et al.* (2012), o desenvolvimento dos tipos mais comuns de câncer resulta da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável deles a dieta alimentar, principalmente quando constituída de alimentos industrializados em demasia.

Com base no contexto abordado, objetivou-se nesse trabalho avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de produtos lácteos achocolatados, do tipo não fermentados,

de cinco companhias alimentícias de relevante atuação no mercado de alimentos em países da América do Sul e Europa, com destaque ao Brasil, através das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A população brasileira passou por mudanças profundas durante as últimas décadas, como o aumento no crescimento da população de forma rápida, houve um declínio nas taxas de mortalidade e de fecundidade, ampliando significativamente a taxa de crescimento corrente da população (CARVALHO, 2004). Com esse aumento populacional surgiu também a necessidade de uma maior produção de alimentos, modificando-se muito as formas de preparo e fabricação destes, pois antigamente os alimentos provinham de regiões próximas, ou vizinhas, porém atualmente, devido à grande demanda, houve a necessidade de trazer alimentos de regiões distantes (SALES et al., 2014). Essa modificação na preparação e fabricação de produtos alimentares acarretou na inclusão de substâncias para preservação da integridade desses alimentos, substâncias conhecidas por aditivos alimentares, que são adicionados aos alimentos em qualquer estágio de sua produção.

Aditivos são definidos pela Portaria nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997, como:

Qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento, esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 1997).

Essa legislação também dispõe que o uso do aditivo não exceda o índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA), a legislação indica quando o uso é proibido, como quando houver suspeitas que o aditivo não é seguro para o consumo humano, ou, quando o uso encobrir falhas no processo/manuseio do alimento, ou até mesmo quando este induzir o consumidor a erro e confusão (BRASIL, 2015). Inicialmente, esses aditivos eram naturais, mas os aditivos sintéticos foram sendo incluídos gradualmente na indústria, tornando-se predominante em relação aos naturais (RANDHAWA; BAHNA, 2009).

Os aditivos alimentares classificam-se em várias classes, dentre elas estão os aromatizantes, corantes, espumantes, umectantes, reguladores de acidez, entre outros. Os microingredientes que se classificam como aromatizantes são substâncias responsáveis por conferir ou intensificar o aroma dos alimentos, são substâncias odoríferas, que proporcionam

cheiro bem próximo ao natural e se classificam nos seguintes grupos: aromatizantes naturais estes são obtidos a partir de vegetais ou animais, por processos físicos ou enzimáticos e aromatizantes artificiais são obtidos por meio de síntese, no caso do uso do aromatizante sintético, é obrigatório que se especifique no rótulo do produto sua presença (MOURA et al, 2016; HONORATO, 2013). Substâncias alimentares da classe dos conservantes são responsáveis por retardar ou impedir alterações provocadas pela ação de enzimas dos microrganismos, ou pela ação de agentes físicos (TONETTO et al., 2008).

Substâncias que se classificam como espessantes, são hidrossolúveis e hidrofílicos, deixam o alimento mais viscoso ou consistente, sem alterar as suas demais propriedades, evita que substâncias em suspensão venham a sedimentar (HONORATO *et al.*, 2013), existem duas fontes em potencial para a extração desses polissacarídeos, uma de origem vegetal obtida através de plantas terrestres e aquáticas, da qual podemos citar: carragena, carboximetil celulose e goma guar. E de origem microbiana que é pela capacidade de biossíntese de alguns microrganismos não patogênicos, dos quais podemos obter os seguintes biopolímeros bacterianos: xantana, gelana e dextrana. essa fonte de hidrocolóides apresenta vantagens como: ingestão sem efeitos adversos, independência de produção com relação as condições climáticas e instabilidade política dos países produtores, o que permite a sua produção, com alto rendimento e baixo custo dos substratos (DIAZ et al., 2004).

Corantes são substâncias que tem a função de intensificar, restaurar ou dar cor aos alimentos, podem ser classificadas em naturais, os quais não devem ser tratados como totalmente seguros só por serem de origem vegetal. Dos artificiais ou sintéticos podemos citar alguns permitidos, que são: amarelo crepúsculo, tartrazina, Bordeaux S, eritrozina, dentre outros (BALBANI et al, 2006; LORENZONE, 2011), sendo os artificiais a classe que possui mais estudos e pesquisas, e vários demonstraram ação carcinogênica (LIMA, 2011).

Estabilizantes é uma classe de aditivo que sua principal função é manter o produto uniforme, ou seja manter uma dispersão uniforme, mantendo as características físicas das emulsões e suspensões, há uma grande quantidade de espessantes permitidos para o uso, podemos citar: citrato de sódio, celulose microcristalina, goma ágar, dentre outros. No processamento de alimentos o amido e seus derivados são amplamente utilizados (LIMA, 2011). No entanto alimentos que contenham essas substâncias devem trazer em seus rótulos a indicação dos utilizados, explicitamente ou através de códigos, sendo descrito por extenso a respectiva classe.

Atualmente há uma grande quantidade de diferentes aditivos químicos no mercado, cerca de 2.700, e essa grande diversidade gera um interesse e uma necessidade de avaliar como também regulamentar o seu uso, de uma forma segura para a saúde humana, sem atrair possíveis riscos (FENG et al., 2012). O comitê *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) encarrega-se de avaliar o potencial tóxico e analisar a quantidade segura de ingestão desses aditivos, através dessa avaliação ele designa a Ingestão Diária Aceitável (IDA). A (IDA) é a quantidade que pode ser ingerida diariamente, e por toda a vida sem causar mal à saúde (POLÔNIO; PERES, 2009).

A partir disso, diversos estudos apontam reações alérgicas, do tipo crônica ou aguda aos aditivos, sobressaindo a categoria infantil, por ser uma das maiores, senão a maior consumidora desses produtos, vale ressaltar que crianças são mais suscetíveis a reações adversas (POLÔNIO; PERES, 2009). Por isso a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) juntamente com outros órgãos regulamentadores estabelecem limites para quantidades que assegurem a saúde, pois o uso inadequado desses aditivos podem ocasionar o surgimento de doenças (BRASIL, 2007).

É importante ressaltar que ainda existem poucos estudos sobre o consumo dessas substâncias, fato de grande relevância para avaliação de ingestão e possíveis efeitos deletérios que essas substâncias possam vir causar ao organismo (POLÔNIO; PERES, 2009). E essas substâncias são utilizadas em larga escala, na indústria de alimentos, e esses alimentos foram introduzidos na dieta da população de forma rápida. MONTEIRO et al (2010) classifica os gêneros alimentares em 3 grupos.

Sendo o grupo 1 os alimentos não transformados ou minimamente processados, e estes passam por processos físicos, que são aplicados em alimentos básicos individuais, com a finalidade de preservá-los tornando-os mais disponíveis, acessíveis, mais seguros e aceitáveis, alguns desses processos são: secagem, refrigeração, redução de gordura, pasteurização, fermentação, embalagem a vácuo, entre outros.

O grupo 2 culinária processada, ou ingredientes de comida industrializada, não são comestíveis, e são desagradáveis por si mesmos, e este grupo é composto por substâncias que são extraídas ou purificadas de alimentos não transformados para produzir ingredientes culinários, esses produtos alimentares do grupo 2 possuem mais energia e menos nutrientes do que os alimentos integrais utilizados para a sua produção, os processos utilizados na produção destes são: processos químicos físicos, moagem, pressão, refinação, hidrogenação e hidrólise,

a utilização de aditivos e enzimas, estes processos são diferentes dos usados na produção dos minimamente processados, pois mudam de forma radical a natureza dos alimentos originais.

E o grupo 3 que são os produtos alimentares ultra- processados, são o resultado da transformação de vários produtos alimentares, incluindo alimentos do grupo 1 e grupo 2, os processos usados para produzi-los são: salgar, adoçar, cozinhar, fritar, fritar profundamente, adicionar fibras sintéticas, vitaminas e minerais, dentre outras. Esses processos são feitos para que os alimentos tornem-se duráveis, acessíveis, convenientes, e são formulados para que suportem o transporte por longas distâncias, e diminuam a deteriorização por ação microbiana. E o sua principal finalidade é que sejam consumidos em qualquer lugar, na rua, enquanto assiste televisão ou conduz um veículo, isso dá acessibilidade ao consumidor final.

TOLLONI et al (2011) diz que em 2007 cerca de 85% dos alimentos que faziam parte da dieta alimentar da população brasileira eram alimentos industrializados, e enfatiza alguns fatores que contribuíram para esse aumento do uso desses alimentos, no qual podemos citar: a influência do mercado publicitário, a globalização, o ritmo acelerado de vida nas grandes cidades. Esses alimentos prontos possuem um perfil nutricional desfavorável, eles também facilitam o hábito de se alimentar antes das refeições estimulando um consumo excessivo de calorias, as características organolépticas juntamente com as estratégias de marketing influenciaram diretamente no crescimento acelerado do consumo desses produtos no Brasil (MARTINS et al., 2013).

As bebidas lácteas são uma realidade no mercado brasileiro, representa 25% do mercado, no total dos iogurtes no Brasil, de acordo com um recente levantamento, e por serem processados de diversas formas, o número de pesquisas que relatam sua estabilidade e seu desenvolvimento tem crescido (PFLANZER et al., 2010). No entanto desde o início da década de 90 a formulação química original básica dos achocolatados lácteos não fermentados, sofreu alterações, com a inclusão de aditivos e substâncias alimentares sintéticas de ações aromatizantes, espessantes, acidulantes e edulcorantes (MIRTEN *et al.*, 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento, é quem rege a confecção e comercialização de alimento lácteos não fermentados, por meio da Portaria Nº 36, de 31 de outubro de 2000, que aprova os regulamentos técnicos para fixação de padrões de identidade e qualidade de bebidas lácteas fermentadas e não fermentadas (BRASIL, 2000). O *Codex Alimentarius* foi a base para a construção do documento brasileiro, sendo este o principal

órgão mundial responsável pelo estabelecimento das normas gerais de formulação química, segurança e rotulagem de alimentos (SILVA et al., 2015; PFLANZER et al., 2010).

Honorato et al, (2014) relata a necessidade urgente de estudos que comprovem a toxicidade do uso de aromatizantes alimentares, pois levanta uma série de dúvidas sobre a toxicidade em nível celular relacionado ao seu uso. Deste modo as agências de vigilância alimentar, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) órgão de segurança alimentar brasileiro, e a *European Food Safety Authority* (EFSA) ressaltam através de seus regulamentos técnicos a necessidade de estudos citotóxicológicos de efeito agudo dos microingredientes alimentares em geral, e especialmente de alimentos industrializados, que estes fazem parte da sua composição. Destacam também que os resultados obtidos nesses estudos servirão de base para possíveis mudanças nas estratégias da Agência de Segurança Alimentar, e consequentemente dos profissionais que são responsáveis pela vigilância alimentar e nutricional da população (BRASIL, 2007; MOURA et al., 2016; SALES et al., 2016). Entretanto, em uma ampla procura na literatura científica, verificou-se que não existem trabalhos de avaliação de toxicidade em nível celular de bebidas lácteas industrializadas, em geral.

Neto et al (2005) menciona que toda informação genética e hereditária, inclusive as mutações que acontecem no material genético, ferramenta essa de grande importância para a variabilidade genética das populações, essas mutações do ponto de vista de um organismo é quase sempre prejudicial, pois em organismos multicelulares essas perturbações inclinam-se a perturbar a fisiologia e o desenvolvimento do organismo. Preservar o meio ambiente tem se tornado cada vez mais preocupante para o mundo atual, pois o uso de produtos como corantes, cosméticos e fármacos têm-se tornado maiores, e tem demonstrado taxas de mutagênese ambiental mais altas.

Neves et al. (2014) salienta o teste de bioensaio com *Allium cepa* L. como eficiente para a avaliação de toxicidade aguda em nível celular de compostos químicos, pois possuem poucos cromossomos, o que auxilia na visualização de alterações cromossômicas. Sendo esse sistema teste muito eficiente, rápido, de baixo custo, e fácil manuseio, já foi validado por muitos pesquisadores, que utilizaram teste *in vivo* de forma conjunta, e obtiveram resultados semelhantes (SALES, 2014). O programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e o programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) validaram o sistema teste de avaliações cromossômicas em *Allium*, como sendo eficiente para análise e monitoramento *in situ* de substâncias genotóxicas (BAGATINI, et al. 2007). Leme, Marin-morales. (2009) considera esse

bioensaio como sendo uma das abordagens mais eficientes na análise de efeitos tóxicos no ambiente, e relata ser um dos mais utilizados para estes fins. Oliveira et al., (2013) e Gomes *et al.*, (2013) realizaram estudos com corantes alimentares, e seus resultados demonstram a importância desse modelo, por apresentar resultados semelhantes a outros ensaios, mostrando ter excelentes parâmetros de análise citotóxica.

A necessidade de identificação de substâncias com potencial mutagênico é crescente, sendo que atualmente a humanidade está cada dia mais exposta a diversos tipos de substâncias químicas, e a diversos agentes físicos que constitui riscos à saúde. O material genético é muito vulnerável à agressões do ambiente, e isso fez com que surgisse uma área de pesquisa, a Genética toxicológica, e esta dedica-se a pesquisas de propriedades mutagênicas e antimutagênicas. O DNA é a molécula alvo da genética toxicológica, e é quem prova de forma circunstancial o efeito genotóxico, ao qual é testado, podendo-se dizer que genotoxicidade é qualquer dano causado à molécula de DNA (ANDRADE, 2007).

Agentes mutagênicos invadem a célula e se dirigem ao núcleo causando alterações no material genético podendo desregular o ciclo celular, esses agentes podem ser substâncias citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, que quando alteram o ciclo, alteram a divisão celular dos tecidos por meio de indução de aberrações celulares, condições que podem desencadear ou mesmo potencializar processos cancerosos (NETO et al., 2005; ZILIFDAR et al., 2014; VALAVANIDIS et al., 2013). Zaineddin et al (2012) ressalta que o aparecimento de diversos tipos comuns de câncer resulta da interação de fatores internos e ambientais, sendo notável neles, que a dieta alimentar é predominantemente constituída de alimentos industrializados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACHOCOLATADOS

Amostras de achocolatados lácteos industrializados, do tipo não fermentados, fabricados pelas empresas de alimentos *Pepsico*[®], *Nestlé*[®], *Maratá*[®], *Piracanjuba*[®] e *Embaré*[®] - referidas adiante como A, B, C, D e E, respectivamente - foram adquiridas em mercado varejista na cidade de Picos, Piauí, Brasil. Teve-se o cuidado de verificar se as amostras estavam dentro do prazo de validade e se suas embalagens estavam intactas. As análises de toxicidade foram realizadas diretamente nos produtos lácteos comercializados.

Figura 1- Achocolatados usados, e as cebolas utilizadas

Fonte: Autoria própria, 2016



3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM RAÍZES DE *ALLIUM CEPA*

Os bulbos de cebola foram colocados em frascos aerados com água destilada, à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$), até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento. Para análise de cada grupo tratamento estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com a suas respectivas amostras de achocolatados

(tratamentos), algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em suas respectivas soluções por 24 horas, procedimento este denominado de tempo de exposição 24 horas.

Após 24 horas 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 48 horas. Após este período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. Os tempos de exposição 24 e 48 horas foram escolhidos com o intuito de avaliar a ação dos tratamentos em mais de um ciclo celular. A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas. Em cada coleta, retirou-se, em média, três raízes por bulbo. Em todos os tempos de exposição considerados, os frascos com os tratamentos em estudo permaneceram em agitação leve e constante. Tal procedimento foi realizado com o intuito de não permitir a precipitação das soluções.

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 400x. Para cada bulbo de cebola analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada controle, tempo de exposição 24 horas e tempo de exposição 48 horas de cada grupo tratamento em análise. Assim para cada grupo avaliado analisou-se um total de 15.000 células. Foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Para o cálculo do índice mitótico (IM) utilizou-se a seguinte equação: (número total de células em mitose ÷ número total de células analisadas) x 100.

Avaliou-se também a toxicidade das amostras de achocolatados por meio da frequência de micronúcleos, metáfases colchícinicas, pontes anáfasicas e telofásicas, ampliações gênicas, células com aderências, brotos nucleares e anáfases multipolares.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o teste do Qui-quadrado (χ^2), com nível de probabilidade <0.05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos (Tabela 1), verifica-se que os achocolatados das cinco empresas consideradas causaram expressiva redução no índice de divisão celular do tecido meristemático analisado, nos dois tempos de exposição considerados, em relação aos índices mitóticos observados para seus respectivos controles. No entanto, quando confrontados os índices mitóticos do tempo de exposição 24 h com os seus respectivos tempo de exposição 48 h, verificou-se que tais alimentos não promoveram redução significativa da divisão celular do tecido analisado.

Tabela 1 - Número de células em cada fase do ciclo celular e de alterações celulares observadas em tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com achocolatados pasteurizados, das empresas alimentícias A, B, C, D e E, avaliados nos tempos de exposição 24 e 48 horas.

ACHOCOLATADOS LÁCTEOS								
Empresa	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
A	CO	3900	450	222	281	147	1100	22,0 ^a
	24 h	4831	124	119	11	15	269	5,4 ^b
	48 h	4754	194	26	13	13	246	4,9 ^b
B	CO	4035	340	247	232	146	965	19,3 ^a
	24 h	4726	141	94	26	13	274	5,5 ^b
	48 h	4850	84	17	27	22	150	3,0 ^b
C	CO	3830	394	254	301	221	1170	23,4 ^a
	24 h	4720	127	85	45	23	280	5,6 ^b
	48 h	4799	91	49	41	20	201	4,0 ^b
D	CO	3998	320	277	213	192	1002	20,0 ^a
	24 h	4602	199	144	24	31	398	8,0 ^b
	48 h	4684	109	95	79	33	316	6,3 ^b
E	CO	3938	299	313	297	153	1062	21,2 ^a
	24 h	4631	121	98	81	69	369	7,4 ^b
	48 h	4699	139	44	99	19	301	6,0 ^b

1A – Pepsico©; B – Nestlé©; C – Maratá©; D – Piracanjuba©; E – Embaré©; TCII – Total de células em interfase e indiferenciadas; TE – Tempo de Exposição; P- Prófase; M- Metáfase; A- Anáfase; T- Telófase; CO – Controle; IM – Índice Mitótico; TCD – Total de células em divisão; valores de IM seguidos da mesma letra dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si, ao nível de 5%, pelo teste χ^2 .

Tabela 2 - Número e tipo de alterações encontradas em cada tempo de exposição das amostras.

Empresa	TE	Metáfase colchicínica	Ponte anáfásica	Ponte telofásica	Micronúcleo	TAC
A	CO	00	00	00	01	01 ^a
	24h	09	11	09	54	83 ^b
	48h	18	07	21	30	76 ^b
B	CO	00	01	00	00	01 ^a
	24h	19	17	09	15	60 ^b
	48h	21	07	07	18	53 ^b
C	CO	00	01	00	00	01 ^a
	24h	08	34	14	32	88 ^b
	48h	13	11	07	40	71 ^b
D	CO	01	00	00	00	01 ^a
	24h	23	15	00	22	60 ^b
	48h	11	21	11	13	56 ^b
E	CO	01	00	00	00	01 ^a
	24h	19	13	03	19	54 ^b
	48h	21	11	11	14	57 ^b

Tabela 2: A – Pepsico®; B – Nestlé®; C – Maratá®; D – Piracanjuba®; E – Embaré®; TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; TCA – Total de Alterações Celulares.

Assim, todas as amostras de achocolatados avaliadas, nas condições de estudos estabelecidas, foram citotóxicas as células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, por terem ocasionado efeito antiproliferativo acentuado aos meristemas de raízes ao qual foram expostos. De acordo com Gomes et al. (2013), Marques et al. (2015), Moura et al. (2016) e Sales et al. (2016), a redução do índice mitótico ocasionada por compostos químicos em tecidos sem nenhum tipo de mutação e/ou alteração celular é prejudicial ao organismo em que ocorrem, em razão de não permitir ou limitar a reposição de células, alterar a produção de proteínas e, conseqüentemente, resultar no mal funcionamento do órgão onde está localizado.

Na Tabela 2, também se observa que todos os achocolatados, nos dois tempos de exposição considerados, induziram a formação expressiva de alterações de fuso mitótico, representadas no presente estudo pelas metáfases colchicínicas e pontes anáfásica e telofásica,

o que caracteriza as amostras avaliadas como genotóxicas, e de quebras cromossômicas, caracterizadas pela formação de micronúcleos.

Alterações de fuso mitótico quando em frequência significativa causam instabilidade nuclear por induzir lesões cromossômicas estruturais, dando origem a fragmentos acêntricos, que, em consequência, formarão os micronúcleos ao final da divisão celular. A presença significativa de células micronucleadas, como a observada aqui com os sucos prontos, classifica substâncias, compostos ou soluções testadas como mutagênicas (CORCUERA et al., 2015). Tal condição com os achocolatados indica que os mesmos devam ser avaliados em sistemas testes animais, uma vez que, de acordo com Queiroz et al. (2013), a ocorrência de alterações celulares, apesar de não ser medida de carcinogenicidade, está frequentemente associada ao aparecimento de câncer, que há correlação positiva entre o aumento de aberrações de fuso mitótico e de células micronucleadas, e a detecção de neoplasias.

A frequência de alterações celulares observadas na Tabela 02 corrobora aos resultados de redução da divisão celular obtido. Aissa et al. (2012) relatam que metáfases com alinhamento incorreto de cromossomos na placa equatorial, as denominadas metáfases colchícnicas, assim como, cromossomos em atraso na anáfase e/ou telófase, conhecidas como pontes anáfasicas e telofásicas, resultam na formação de células com números cromossômicos distintos, bem como com alterações cromossômicas estruturais. Considerando que o princípio do ciclo celular é a formação de células idênticas, a produção de células com alteração na estrutura e/ou no número cromossômico, que tornam o funcionamento celular inviável, tendem a ser eliminadas de tecidos com funcionamento normal.

Conforme mencionado anteriormente, não existem na literatura científica, até o momento, trabalhos de avaliação toxicológica em nível celular referentes a bebidas lácteas industrializadas não fermentadas. Entretanto, são encontrados trabalhos de avaliação de citotoxicidade de alguns dos constituintes químicos das classes de aditivos alimentares presentes na formulação destes alimentos, conforme descrito no documento técnico que regulariza estes preparados líquidos (BRASIL, 2006). Porém, é de grande importância mencionar que a composição química de achocolatados lácteos, como estes avaliados no presente estudo, é permitida e assegurada pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e internacional (FAO, 2016).

Dentre os edulcorantes encontrados nestes achocolatados estão o aspartame, o ciclamato de sódio, o acesulfame de potássio e a sacarina sódica. Van Eyk et al. (2015), verificaram, por

meio das linhagens celulares Caco-2 (células de colón), HT-29 (células de cólon) e HEK-293 (células de rim), que estes edulcorantes foram citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos as células estudadas. Corroborando aos resultados destes pesquisadores, Sasaki *et al.* (2002), através do teste do cometa, observaram que o sacarina sódica e o ciclamato de sódio foram genotóxicos e mutagênicos as células de cólon de roedores.

Na formulação química destes produtos lácteos também encontra-se o aditivo de aroma e sabor sintético artificial de chocolate, aditivo que reforça o aroma de cacau em pó presentes nas bebidas lácteas achocolatados. Marques *et al.* (2015) avaliaram a toxicidade em nível celular de aromatizantes de chocolates e verificaram que este microingrediente alimentar reduziu drasticamente a divisão celular e causou aberrações celulares a meristemas de *A. cepa*. Da mesma forma, Sales *et al.* (2016) avaliaram a ação de aromatizantes de chocolates em medula óssea *in vivo* de camundongos, e verificaram que este aromatizantes causou redução na maturação de eritrócitos e induziram a formação de micronúcleos no tecido hematopoiético avaliados, mostrando-se citotóxicos e mutagênicos.

5 CONCLUSÃO

Todas as amostras de achocolatados avaliadas foram citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas as células meristemáticas de raízes de *A. Cepa*. Os resultados obtidos neste estudo, aliados aos dados de toxicidade em nível celular de alguns dos aditivos alimentares presentes na formulação básica de bebidas lácteas achocolatadas, sinalizam a necessidade de avaliações mais detalhadas, em sistemas testes com maior nível de complexidade, para que então se possa estabelecer com segurança a toxicidade em nível celular desses alimentos, e assegurar a saúde de quem os consome.

Referências

AISSA, A.F; BIANCHI, M.L.P; RIBEIRO, J.C; HERNANDES, L.C; FARIA, A.F. **Mercadante AZ, Antunes, LMG. Comparative study of β -carotene and microencapsulated β -carotene: Evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects.** *Food Chem Toxicol.* v.50.n.5, p 1418-1424; 2012

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

AQUINO, R.C.; PHILIPPI, S.T. **Consumo infantil de alimentos industrializados e renda familiar na cidade de São Paulo.** *Revista de Saúde Pública,* v.36, p.655-660, 2002.

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

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. **Excipientes de medicamentos e as informações da bula.** *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, Botucatu,* v.3, n.72, p. 400 - 4006, mai./jun. 2006

BATISTA, M.A; GAMA, L.L.A; ALMEIDA, L.P.D; ORNELLAS, C.B.D; SANTOS, L.C.D; SILVESTRE, M.P.C. **Development, characterization and sensory analysis of food preparations for children containing whey proteins or albumin.** *Braz J Food Techn.* v.18; n.1; p 31-41; 2015

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M.S.; MARIN-MORALES, M.A. **Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture.** *Journal of Environmental Sciences,* v. 36, p.102-111, 2015.

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: 27 de maio de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. **Portaria no 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos**

Alimentares – definições, classificações e emprego. [acesso em 2016 Jun 01]; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>

BRASIL. Ministério da Saúde (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia aditivos alimentares REVISADO 2015.pdf(versão 1.0).** [acesso em 2016 jun 01]; [aproximadamente 24 páginas]. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>

CAMPOS-VENTURA, B.; MARIN-MORALES, M.A.; DESK, S. **Micronuclei and chromosome aberrations derived from the action of Atrazine herbicide in *Allium cepa* meristematic cells.** *SDRP Journal of Earth Sciences & Environmental Studies*, v. 1, n. 1, p. s/n, 2016.

CAMPUS-PEREIRA, F. D.; GONÇALVES, L.; HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. **Action of a polyamine putrescine in genetic material of *Allium cepa*.** *Toxicology Letters*, v. 238, n. 2, p. 120-121.

CARVALHO, José Alberto Magno de. **Crescimento populacional e Estrutura Demográfica do Brasil.** UFMG/cedeplar, 2004.

CORCUERA, L.A.; VETTORAZZI, A.; ARBILLAGA, L.; PÉREZ, N.; GIL, A.G.; AZQUETA, A.; DE CERAIN, A. L. **Genotoxicity of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A after simultaneous application of the in vivo micronucleus and comet assay.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 76, n. s/n, p. 116-124, 2015.

DIAZ, O.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. **Reologia de xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana.** Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, 2004; v.25, p.15-28.

FENG, J.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, H. **Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota.** *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, v. 1, n. 4, p. 568-86, 2012

GOMES, K.M.S.; OLIVEIRA, M.V.G.A.; CARVALHO FRS, MENEZES, CC, PERON AP. **Cytotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tartrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells.** *Food Science and Technology*, v. 33, n. 1, p. 218 – 223, 2013.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002, 304p.

HERRERO, O., MARTÍN, J.P.; FREIRE, P.F.; LÓPEZ, L.C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M.J. **Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test.** Mutation Reserch, v.743, p. 24-34, 2011.

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

LACERDA, L.P.; MALAQUIAS, G.; PERON, A.P. **Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 89, n. 3, p. 1147-1150, 2014.

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

LORENZETI, A.S.G; **Aditivos presentes em Alimentos para o público infantil, comercializados no Brasil.** Trabalho de conclusão de curso (Curso Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS-RS, 2011

MINTEM, G. C., VICTORA, C. G., & da COSTA LIMA, R. (2013). **Fatores associados com conhecimento e preferências alimentares em crianças de 3-9 anos na cidade de Pelotas, Brasil.** *Journal of Health & Biological Sciences*,1(1), 27.

MARTINS, A. P. B; LEVY, R. B; CLARO, R. M; MOUBARAC, J. C; MONTEIRO, C. A. **Participação crescente de produtos ultraprocessados na dieta brasileira (1987-2009).** Rev Saúde Pública 2013;47(4):656-65

MONTEIRO, C.A.; LEVY, R.B.; CLARO, R.M.; CASTRO, I.R.; CANNON, G. **Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil.** Public Health Nutr. 2011;14(1):5-13. DOI:10.1017/S1368980010003241

MOURA, A.G.; SANTANA, G.M.; FERREIRA, P.M.P.; SOUSA, J.M.C.; PERON, A.P. **Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allium cepa* L root meristems.** Brazilian Journal of Biology, v. 76, n. 2, p. 39-443, 2016.

NETO, J. X. A.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; SILVA, J. C.; DANTAS, J. P. **Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mil) através do teste de micronúcleo em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *IN VIVO*.** REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIA DA TERRA, Volume 5 - Número 2 - 2º Semestre 2005.

NEVES, E.S.; FERREIRA, P.M.P.; LIMA, L.H.; PERON, A.P. **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, n. 3, p. 1131-1137, 2014.

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

OLIVEIRA, M.V.A.; ALVES, D.D.L.; LIMA, L.H.G.M.; CASTRO, J.M.C., PERON, A.P. **Cytotoxicity of erythrosine (E-127), brilliant blue (E-133) and red 40 (E-129) food dyes plant test system.** Acta Scientiarum. Biological Science, v. 35, n. 4, p. 557-562, 2013.

OLIVEIRA, J. M., CASTRO, I. R. R. D., SILVA, G. B., VENANCIO, S. I., & SALDIVA, S. R. D. M. (2015). **Assessing complementary feeding practices in the first two years of life: a proposal for indicators and a monitoring tool.** *Cadernos de Saúde Pública*, 31(2), 377-394.

PFLANZER, S. B., CRUZ, A. G. D., HATANAKA, C. L., MAMEDE, P. L., CADENA, R., FARIA, J. A. F., & SILVA, M. A. A. P. D. (2010). **Perfil sensorial e aceitação de bebida láctea achocolatada.** *Food Science and Technology (Campinas)*.

QUEIROZ, F.M.D.; MATIAS, K.W.D.O.; CUNHA, M.M.F.D.; SCHWARZ, A., 2013. Evaluation of (anti) genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow using the micronucleus test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 135-148, 2013.

RANDHAWA, S.; BAHNA, S.L. **Hypersensitivity reactions to food additives. Current opinion in allergy and clinical immunology**, Hagerstown, v.9, n.3, p.278-283, 2009.

SANTANA, G.M.; DEUS, M.S.M.; SOUSA, J.M.C.; FERREIRA, P.M.P.; FERNANDES, H.B.; PERON, A.P. (2016). Antimitotic and antimutagenic action of the *Hymenaea stigonocarpa* bark on dividing cells. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 520 – 525, 2016.

SASAKI, Y.F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. **The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives.** Mutation Research, v. 519, n. 2, v. 1-2, p. 103-119, 2002.

TABREZ, S.; SAHKIL, S.; UROOJ, M.; DAMANHORI, G.A.; ABUZENADAH, A.M.; AHMAD, D. **Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an over view of the techniques and their efficacies**. Journal of Environmental Science and Health, Part C, v. 29, n. 3, p. 250-275, 2011.

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

TONETTO, A.; et al. **O Uso de Aditivos de Cor e Sabor em Produtos Alimentícios. Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Faculdade de ciências farmacêuticas, nov.2008.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, K.; LORIDAS, S. **Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms**. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 10, n. 9, p. 3886-3907, 2013.

VAN EYK, A.D. **The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells**. Drug and Chemical Toxicology, v. 38, n. 3, p. 318-327, 2015.

ZAINEDDIN, A.K.; BUCK, K.; VRIELING, A.; HEINZ, J.; FLESCH-JANYNS, D.; LINSEISEN, J.; CHANG-CLAUDE, J. **The association between dietary lignans, phytoestrogen-rich foods, and fiber intake and postmenopausal breast cancer risk: a German case-control study**. Nutrition and Cancer, v. 64, n. 5, p. 652-665, 2012.

ZILIFDAR, F.; ALPER-HAYTA, S.; YILMAZ, S.; KAPLAN-ÖZEN, Ç.; FOTO, E.; AYDOĞAN, Z.; YILDIZ, I.; AKI, E.; YALÇIN, I.; DIRIL, N. **Genotoxic potentials and eukaryotic DNA topoisomerase I inhibitory effects of some benzoxazine derivatives**. Medicinal Chemistry Research, v. 23, n. 1, 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, Hélia de Alencar Martins,
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 Celular de Bebidas Lácteas Acheada
tadas Não Fermentadas
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 14 de Agosto de 2017.

Hélia de Alencar Martins
Assinatura

Hélia de Alencar Martins
Assinatura