



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

JANAINA BARBOSA SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES, SINTÉTICOS EM
CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE CAUDAL DE CAMUNDONGOS *Mus
musculus* L.**

PICOS, PIAUÍ
2016

JANAINA BARBOSA SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES, SINTÉTICOS EM
CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE CAUDAL DE CAMUNDONGOS *Mus
musculus* L.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Licenciatura 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

S586a Silva, Janaina Barbosa.

Avaliação da toxicidade de aditivos alimentares, sintéticos em células de medula óssea e sangue caudal de camundongos *Mus musculus L.* / Janaina Barbosa Silva. – 2016.

CD-ROM : 4 ¾ pol. (27f.)

Monografia (Licenciatura plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí.

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

1. Aromatizantes Alimentares. 2. Células Hematopoiéticas. 3. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 581.4

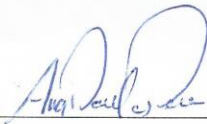
JANAINA BARBOSA SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES, SINTÉTICOS EM
CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE CAUDAL DE CAMUNDONGOS *Mus
musculus* 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 09 / 09 / 16

BANCA EXAMINADORA



PROF^a. DR^a. ANA PAULA PERON (ORIENTADORA)
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – UFPI



PROF^a. MS^a. EMARIELLE COELHO PARDAL (EXAMINADORA)
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – UFPI



PROF^a. MS^a. PATRICIA DA CUNHA GONZAGA (EXAMINADORA)
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – UFPI

RESUMO

Objetivou neste trabalho avaliar a toxicidade em nível celular de aditivos alimentares, de aroma e sabor, de Uva e Ameixa, nas doses de 2 e 4 µl. Esta avaliação se deu por meio de células de medula óssea e de sangue periférico caudal de camundongos *Mus musculus*. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que os dois aromatizantes, nas duas doses avaliadas, induziram um número estatisticamente significativo de micronúcleo em, pelo menos, um dos sistemas testes utilizados. Portanto, nas condições analisadas, os aromatizantes alimentares de Uva e Ameixa foram demonstraram potencial citotóxico e mutagênico.

Palavras-chaves: Aromatizantes alimentares. Células hematopoiéticas, Citotoxicidade, Mutagenicidade.

ABSTRACT

The objective in this study was to evaluate the toxicity at the cellular level of food additives, aroma and flavor, grape and plum, in doses 2×10^4 and 4×10^4 μl . This assessment is made by means of bone marrow cells and peripheral blood flow mice *Mus musculus*. From the results, it was found that the two flavorants, in both doses evaluated induced a statistically significant number of micronucleus at least one of the test systems used. Therefore, the conditions analyzed, food flavoring grape and plum were demonstrated cytotoxic and mutagenic potential.

Keywords: Food flavorings, Hematopoietic cells, Cytotoxicity, Mutagenicity.

Dedico este trabalho a Deus e a minha família. A Deus por ter me dado forças para chegar até aqui e a minha família por acreditar e me apoiar nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me iluminado e me abençoado na minha formação acadêmica, por ter me dado força, coragem e determinação para superar todos os obstáculos e por nunca ter me abandonado nas horas mais difíceis da minha vida, além de enviar pessoas iluminadas para estarem ao meu lado.

À toda minha família, especialmente à minha mãe Graça Leal, minha madrinha Maria Ferreira, minha vó Solidade Barbosa e aos meus irmãos que foram as pessoas cruciais que me fizeram acreditar que eu poderia conseguir todos os meus objetivos e me apoiaram em todas as dificuldades. Obrigada por terem sido e continuarem sendo meu suporte, e me entenderem sempre.

Agradeço a todos aos meus amigos, principalmente o Eduardo Sousa, Natanael da Silva, Jucilene da Silva, Francisco José Azevedo e Francisco Antônio Batista, pela compreensão, amizade, paciência e por estarem presentes em todos os momentos do meu percurso acadêmico, pois os mesmos foram fundamentais.

À minha orientadora Prof.^a Dr^a Ana Paula Peron, pela paciência, atenção e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, sendo muito importante no meu aprendizado, e a todos os professores da UFPI que colaboraram para a minha formação.

LISTA DE TABELA

Tabela 01 - Potencial citotóxico e mutagênico de aromatizantes de ameixa e uva, nas doses de 2 e 4 µl, em células de sangue periférico caudal e de medula óssea femoral de camundongos <i>Mus musculus</i> L., tratados via oral por um período de tratamento de sete dias.....	19
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Teste de Micronúcleo via punção caudal de camundongos.....	18
3.2 Teste do Micronúcleo via células da medula óssea de camundongos.....	19
3.3 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

Os aromatizantes alimentares sintéticos são aditivos ou microingredientes alimentares responsáveis por conferirem propriedades sensoriais de aroma e sabor aos mais variados tipos de alimentos industrializados (XU et al., 2013; MARQUE et al., 2015). Possuem formulação química complexa, constituída por várias classes de compostos químicos, como diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsificantes, estabilizantes, reguladores de acidez, realçadores de sabor, antiulectantes, antiaglutinantes, corantes, e solventes de extração e processamento (BRASIL, 2007; KOCA et al., 2015). Em âmbito mundial, tais aditivos são normatizados pelas agências *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *Flavour and Extract Manufactuer Association* (FEMA) (XU et al., 2014), e nacionalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007 (BRASIL, 2007).

Apesar de imprescindíveis na confecção de alimentos industrializados, os microingredientes aromatizantes são considerados um avanço polêmico da ciência e tecnologia de alimentos por especialistas de diferentes áreas da saúde. Tais profissionais alegam que estes aditivos contribuem de forma significativa para o empobrecimento da dieta e para o desencadeamento ou potencialização de patologias, como distúrbios no funcionamento do trato digestório e reações alérgicas (KONISH et al., 2011; KOCA et al., 2015; MARQUES et al., 2015). Ademais, peritos da área de segurança alimentar declaram que estes aditivos, principalmente os sintéticos, suscitam uma série de dúvidas quanto aos seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, uma vez que, estudos sobre a toxicidade em nível celular de tais substâncias são praticamente inexistentes na literatura científica (KONISHI et al., 2011; MARQUES et al., 2015; KOCA et al., 2015). Em razão desta carência de informações, até o momento, os órgãos de vigilância alimentar ainda não possuem normatizados em documento os índices de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para estas substâncias (ZEQUIN et al., 2011; MORE et al., 2012; MARQUES et al., 2015).

Compostos citotóxicos e/ou genotóxicos têm o potencial de alterar mecanismos celulares vitais, como a duplicação e a transcrição gênica, e promover alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas. Estas alterações podem comprometer significativamente a divisão celular do tecido ou órgão afetado e desencadear e/ou potencializar processos cancerosos (BAGATINI et al., 2007; VALAVANIDIS et al., 2013; ZILIFDAR et al., 2014). De acordo com Zaineddin et al. (2012), o desenvolvimento dos tipos mais comuns de câncer resulta da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável deles a dieta

alimentar, principalmente quando constituída por alimentos industrializados em demasia. Bendino et al. (2012) e Louzada et al. (2015) citam que, mais de 40% dos diversos tipos de câncer, são iniciados ou potencializados em razão de dietas inadequadas ricas em aditivos alimentares.

Dentre os métodos para avaliação de toxicidade genética *in vivo*, o teste de micronúcleo em células de medula óssea, bem como o de sangue periférico caudal, de roedores tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica (MATEUCA et al., 2006). Este teste detecta alterações genômicas e/ou dano ao aparato mitótico, sendo os micronúcleos indicativos de perdas irreversíveis de DNA. Embora a toxicidade genética não seja medida de carcinogenicidade, esta é frequentemente associada ao aparecimento do câncer, visto que, existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em mamíferos (AZEVEDO et al., 2003; REZENDE, PALHAES, CUNHA, 2006; BOSQUESI et al., 2008).

Dessa forma, com base no contexto abordado, propôs-se no presente estudo avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade de aromatizantes alimentares sintéticos, do tipo idêntico ao natural, de Ameixa e Uva, por meio da frequência de micronúcleos presentes em células de sangue periférico caudal e de medula óssea de camundongos *Mus musculus* L. Estes aditivos foram escolhidos para avaliação em virtude de serem extensivamente utilizados na indústria alimentícia na confecção de alimentos doces.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O Homem usa técnicas de conservação de alimentos desde os primórdios da civilização. Usava o sol e o sal como forma de conservação para peixes e carnes, o açúcar para frutas, entre outros. Já na atualidade existem várias outras formas de conservar os alimentos, dentre estas estão os aditivos (TONETTO et al., 2008) que são de fundamental importância no desenvolvimento e processamento dos mesmos. Porém, este é um tema que gera grande preocupação, pois os aditivos estão entre os itens mais controversos no que diz respeito à segurança alimentar, o que nos últimos anos tem levado os consumidores a estarem mais precavidos quanto ao seu uso (VARELA; FISZMAN, 2013).

Segundo Polonio (2009), os aditivos alimentares são componentes adicionados aos alimentos, tendo a função de modificar as características dos mesmos, atribuindo valor nutricional ou não, sendo cada vez mais utilizados para fins tecnológicos (incluindo os organolépticos) nas fases de fabricação dos alimentos.

No Brasil, o uso de alguns aditivos torna-se ainda mais preocupante, pois não são controlados rigorosamente. Um exemplo é o nitrato e nitrito, que são compostos encontrados nos produtos cárneos, que podem está associado com o câncer de estômago. Estes aditivos possuem agentes que formam carcinógenos, além de serem teratogênicos e mutagênicos (CÂMARA, 2006), Ainda assim a Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia diz que, comportamentos adversos aos conservantes, corantes e aditivos alimentares são raros, entretanto, não devem ser menosprezados (HONORATO; NASCIMENTO, 2011).

Devido o desenvolvimento dos avanços tecnológicos, houve um aumento de produção e acréscimo de aditivos nos alimentos, o que fez surgir mais substâncias com potencial mutagênico e carcinogênico nestes. Levando em consideração a grande quantidade de aditivos existentes, é recomendável que as mesmas sejam sempre submetidas a avaliações rigorosas quanto à capacidade mutagênica e carcinogênica (BAYNES, 2000; SANSEVERINO, 2001). Este controle é muito exigido pelas agências reguladoras, por isso, é de suma importância estudos que avaliem seus potenciais toxicológicos envolvendo todos os tipos de aditivos alimentares, tanto a nível celular quanto sistêmico (FENG et al., 2011, LERNER et al., 2015).

Os aditivos alimentares podem ser classificados como antioxidantes, corantes, estabilizantes, emulsificantes, umectantes, conservantes, acidulantes e aromatizantes. Os antioxidantes são componentes que tem a função de retardar a ação oxidativa dos alimentos, evitando que o produto se deteriore em contato com o ar, uma vez que o mesmo impede que

os óleos e gorduras (ricos em ácidos graxos insaturados) se combinem com o oxigênio do ar (CARVALHO, 2005).

Segundo Lima et al. (2010), os principais antioxidantes dietéticos são algumas vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides que agem sobre os radicais livres presentes nos alimentos, inibindo a degradação oxidativa. Já os antioxidantes sintéticos são utilizados para prevenir e retardar a ação oxidativa lipídica.

De acordo com Carvalho (2005), os corantes são aditivos que podem alterar a coloração deixando mais intensa ou restaurar a cor dos alimentos, com a finalidade de deixá-los mais atrativos, podendo ser divididos em dois grupos: os naturais, que são advindos de vegetais, e os sintéticos, que são produzidos pelas indústrias de alimentos.

Os estabilizantes são responsáveis por assegurar as características físicas de emulsões, geralmente utilizados em doces, sobremesas, sopas, achocolatados, sucos, concentrados entre outros, evitando com o tempo a separação de ingredientes, atuando como uma interação homogênea como, por exemplo, a água e o óleo (VALSECHI, 2001).

Os emulsificantes são aditivos funcionais utilizados nas indústrias de alimentos mantendo uma dispersão uniforme de um líquido em outro, tornando mais uniformes misturas de duas ou mais fases imiscíveis no alimento, como é o caso da água e o óleo. O chocolate, margarinas, e alguns salgadinhos são um dos principais produtos que, devido uso da lecitina e os polisorbatos, é possível manter a uniformidade entre as misturas (AUN et al., 2011).

Os umectantes tem a função de absorver e capturar a água dos alimentos, além de inibirem o crescimento de certos microrganismos. São utilizados na conservação de bebidas, alimentos, balas e outros produtos alimentícios. O sorbitol é um tipo de umectante usado em produtos que tendem ao endurecimento (HONORATO et al., 2013).

Os conservantes são componentes adicionados aos alimentos com o intuito de impedir ou retardar alterações provocadas por microrganismos e para isso os alimentos precisam ser quimicamente tratados, o que garantirá maior durabilidade e conservação. Essas substâncias são muito utilizadas nas indústrias alimentícias, porém o uso pode ocasionar riscos à saúde humana. Um exemplo é o sódio, que devido conter substâncias tóxicas e se consumido de forma exagerada, pode levar o indivíduo a ter hipertensão (HONORATO et al., 2013).

Para Lorenzoni (2011), acidulantes são componentes que tem a função de ajustar o pH do produto, ou seja, confere ou diminui a acidez, favorecendo a conservação e protegendo os alimentos da ação de microrganismos. Os mais utilizados são: os ácidos cítricos, pois se dissolve rapidamente o que beneficia a estabilidade do produto final; fosfóricos, utilizados em bebidas a base de cola podendo afetar de forma negativa a saúde dos indivíduos que fazem

uso de refrigerantes e café, isto devido à geração de carga ácida; e lácticos são utilizados por já estarem presente naturalmente em derivados lácteos e por seu sabor residual ser mais suave do que outros ácidos (HONORATO et al., 2013).

Os aromatizantes são um dos tipos de aditivos alimentares que proporcionam ou intensificam aromas e sabores aos alimentos sem ter a função de nutrir (MOODIE et al., 2013), podendo ser classificados como naturais, sintéticos idênticos aos naturais e sintéticos artificiais (PIERCE et al., 2014). Aromas naturais são substâncias cuja elaboração é feita exclusivamente com matéria prima, que são obtidas a partir de matérias vegetais ou animais, seja por extração (processos físicos) ou enzimáticos (processos biotecnológicos) (LUERCE, 2008).

Os aromas sintéticos são substâncias químicas adquiridas por processos químicos incluindo os aromatizantes sintéticos artificiais e aromatizantes sintéticos idênticos aos naturais. O primeiro é obtido por síntese de substâncias que não são de origem vegetal e ou animal, que são preparadas para o consumo humano. Nestes produtos é muito importante a inserção do rótulo descrevendo que o mesmo é artificial, porém não é obrigatório. Já o segundo são compostos químicos obtidos por sínteses a partir da matéria-prima de origem animal, vegetal ou microbianas que apresentam estruturas químicas semelhantes (TONETTO et al., 2008).

Salinas et al. (2009) relatam que o estilo de vida da sociedade nas ultimas décadas tem gerado questionamentos a respeito dos hábitos alimentares, pois a população faz grande uso de fast food, que em sua maioria contém altas concentrações de aditivos alimentares o que gera grande risco de desenvolver doenças crônicas a longo prazo.

A toxicologia de alimentos tem se destacado na Indústria Alimentícia, pois é responsável por procurar e pesquisar detalhadamente a sua composição, seus efeitos nocivos, servindo também para estabelecer limites de segurança para determinados componentes. (TORRES; MACHADO, 2001).

Em âmbito mundial, a fiscalização é feita pelas agências regulamentadoras: Codex Alimentarius Commission, Food and Drug Administration (FDA), Flavour and Extract Manufacturers Association (FEMA), e no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes órgãos monitoram a utilização e a quantidade máxima tolerável dos aditivos alimentares (ANVISA, 2007, OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto os mesmos não especificam quais os compostos utilizados, as concentrações, e a quantidade de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de aromatizantes contidos nos alimentos (GOMES et al., 2013, MARQUES et al., 2015).

O Comitê do Codex Alimentarius da Organização Mundial de saúde (FAO/OMS) sobre aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) criou o Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares ou o INS (International Numbering System) com o propósito de descrever os aditivos alimentares nas listas de ingredientes, sendo que no rótulo do produto, o aditivo deverá ser diferenciado dos demais, sendo indicado pelo nome do aditivo ou INS (AUN et al., 2011).

Lima (2013) relata que a autorização dos aditivos alimentares se dá a partir do momento que os mesmos tenham sido submetidos adequadamente a testes toxicológicos, levando em consideração qualquer efeito acumulativo, sinérgico e de proteção em relação ao seu uso, entre outros aspectos, sendo sua segurança primordial. Os testes avaliativos são baseados no controle das IDAs (Ingestão Diária Aceitável) analisados a partir de dados científicos desenvolvidos pelo Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (OMS) / Organização das Nações Unidas Para a Agricultura e Alimentação (FAO)(FAO/WHO,1969).

Determinados componentes químicos presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e /ou carcinogênicos. Segundo Antunes (2000), os efeitos mutagênicos são danos genéticos causados por agentes físicos, químicos e biológicos, gerando alterações nas células de um organismo, determinando a morte celular ou levando a um crescimento desordenado das células. Entretanto, apenas um pequeno número de alterações em genes específicos pode determinar vantagens para o organismo, podendo todos esses tipos de alterações ou mutações serem transmitidas aos seus descendentes. Já o efeito antimutagênico é causado por um agente mutagênico, ou seja, tem a ação inversa, impede a formação das mutações (RIBEIRO; SALVADORE; MARQUES, 2003).

Existem no mundo mais de 11 milhões de componentes químicos de acordo com a ACS (American Chemical Society), sendo que na Indústria alimentícia, farmacêutica e no uso doméstico existem cerca de 80 mil substâncias químicas. Este fato mostra a grande exposição do homem a esses produtos químicos, uma vez que os mesmos só se tornam prejudiciais à saúde se houver a ingestão no organismo (PIMENTEL et al., 2006).

Segundo Sasaki et al. (2002), 39 substâncias químicas foram analisadas como aditivos alimentares, onde estas causaram genotoxicidade, sendo os corantes os mais genotóxicos. As formas de administração, durabilidade e a frequência de exposição são fatores determinantes que influenciam a toxicidade em um organismo, sendo encontrados no interior das células, não estando livres de alterações ou mutações, uma vez que seus efeitos tóxicos, só se

manifestam se o agente tóxico alcançar locais específicos em razão do consumo de concentrações e tempo suficiente desses efeitos (BARROS et al., 2008).

O grande consumo de aditivos alimentares tem gerado grande preocupação aos pesquisadores da área de saúde, devido ao aumento do consumo de produtos industrializados e a grande diminuição de alimentos caseiros, sendo que as crianças fazem parte da classe mais afetada, pois possuem um peso menor e, portanto uma menor tolerância (POLÔNIO; PERES, 2009).

O bioensaio é considerado uma das abordagens mais rotineiras e eficientes para determinar efeitos tóxicos de substâncias químicas no ambiente. Atualmente, as agências reguladoras e comunidades científicas utilizam testes para investigação e avaliação da mutagenicidade e toxicidade genética de compostos *in vitro*, especialmente o teste do micronúcleo em células de medula óssea e sangue periférico de camundongos (MATEUCA et al., 2006). Estes tipos de testes são os mais utilizados na área da genética toxicológica. (VALADARES et al., 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos do presente trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí (Picos, Piauí, Brasil), entre os meses de janeiro e agosto do ano de 2015. Para a avaliação da toxicidade utilizou-se camundongos, machos e fêmeas, da espécie *Mus musculus* (linhagem Swiss Webster), com 40g, em média, de peso corpóreo, saudáveis e com três meses de nascidos. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

Os aromatizantes alimentares sintéticos líquidos, do tipo idêntico ao natural, de aroma e sabor uva e ameixa, foram obtidos de uma revendedora especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos localizados na região nordeste do Brasil. Os aromatizantes, de aspecto oleoso, estavam acondicionados em frasco âmbar com capacidade para 100 ml, e encontravam-se dentro do prazo de validade. Como não há IDAs definidos para os aditivos de aroma e sabor, estabeleceu-se para cada aromatizante em estudos as doses de 2 e 4 µl.

Os animais foram tratados com as doses estabelecidas para os aromatizantes por via oral ou gavagem durante sete dias, e sacrificados no oitavo dia por meio de inalação de éter sulfúrico. Para cada dose avaliada utilizou-se um total de três animais. Já os camundongos representantes do controle positivo receberam tratamento diferenciado, onde se aplicou apenas uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida, na concentração 50 mg/kg, 24 horas antes do sacrifício. As amostras de sangue periférico e de medula óssea foram coletadas por punção caudal e extração de medula óssea dos fêmures, após os tempos de exposição de cada tratamento. As condições ambientais foram padronizadas e monitoradas em todo o tempo de experimento, com ciclo de vigília de doze horas e de escuro por mais doze, e temperatura de 23 ± 2 °C. O protocolo experimental proposto neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Pesquisa Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí, sob identificação 034/2014.

3.1 Teste de Micronúcleo via punção caudal de camundongos

O teste de micronúcleos foi realizado utilizando células sanguíneas de sangue periférico, obtidas por meio de punção caudal. Depois da coleta a amostra foi distribuída em duas lâminas para cada animal e foram feitos os esfregaços. Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em Metanol P.A. e posteriormente coradas durante 10

minutos numa solução de 3% de Giemsa. A frequência de 2000 células (1000 células por lamina) foi observada em cada camundongos para determinar a propriedade mutagênica dos edulcorantes avaliados. A análise dos resultados dos dois testes realizados foi executada pelo teste RM-MANOVA seguido do pós teste de Tukey, utilizando o programa STATISTIC 7.0. O valor de $p < 0.05$ foi utilizado como valor de significância.

3.2 Teste do Micronúcleo via células da medula óssea de camundongos

Após o sacrifício do animal, foi coletado o sangue da medula espinhal e colocada em meio de cariótipo. A suspensão foi centrifugada, por 5 minutos, a 1000rpm, e o sobrenadante foi descartado com o auxílio da pipeta de Pasteur, e com esse material foram feitos os esfregaços. Os esfregaços foram preparados adicionando-se uma gota da suspensão na lâmina (previamente marcada com o código do animal) e com o auxílio de outra lâmina inclinada num ângulo de 45° se fizeram dois esfregaços por animal. Depois de secadas em temperatura ambiente, as preparações foram fixadas em Metanol P. A., durante 10 minutos e novamente deixadas para secar ao ar.

A coloração das lâminas foi feita com o corante Giemsa diluído em solução tampão fosfato com pH 6,8, na proporção de 1:10, durante 15 minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e deixadas secar ao ar. Para a leitura das lâminas foi utilizado microscópio óptico com objetiva de aumento de 100 vezes, onde foram contados 200 eritrócitos policromáticos (PCE) para cada esfregaço. Para a determinação da citotoxicidade, um total de 400 eritrócitos (eritrócitos policromáticos mais eritrócitos normocromáticos) foram contados por animal (200/lâmina) e o registro da frequência de PCEs foi calculado ($PCE/PCE+NCE$). Para avaliação mutagênica (MN) foram analisados 1.000 eritrócitos por lâmina, em triplicata.

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados utilizando o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) e o teste *a posteriori* de Tukey. O programa estatístico utilizado foi o STATISTIC 7.0. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante mencionar que, de acordo com o Regulamento Técnico sobre Aromatizantes/Aroma e Sabor aprovado pela ANVISA em 2007 e ainda em vigência, a formulação de qualquer aromatizante alimentar sintético é padronizada mundialmente, sendo de responsabilidade das agências de segurança alimentar a fiscalização de tal composição (BRASIL, 1999; BRASIL, 2007; MARQUES et al., 2015). Convém ressaltar que este foi o primeiro estudo a avaliar a toxicidade em nível celular, utilizando como organismo de prova roedores, administrando as soluções aromatizantes de Uva e Ameixa, substâncias estas comercializadas livremente no mercado varejista.

Na Tabela 01, são apresentados os resultados de citotoxicidade e mutagenicidade dos aromatizantes alimentares de Ameixa e Uva, analisados em duas doses, frente a células hematopoiéticas de camundongos. Os resultados apresentam os valores significativos de ANOVA One-way com pós teste de Tukey, a 5%.

Tabela1: Potencial citotóxico e mutagênico de aromatizantes de ameixa e uva, nas doses de 2 e 4 µl, em células de sangue periférico caudal e de medula óssea femoral de camundongos *Mus musculus* L., tratados via oral por um período de tratamento de sete dias.

Doses	Aromatizante	MN em células de medula óssea	MN em células de sangue caudal
CN	Água destilada	1,12 ± 0,32	3 ± 2,52
CN		1,12 ± 0,32	3 ± 2,52
2 µl	Uva	0,72* ± 0,14	10,66* ± 9,85
2 µl	Ameixa	0,70* ± 0,07	3,33 ± 2,06
4 µl	Uva	0,61* ± 0,09	23* ± 4,38
4 µl	Ameixa	0,54* ± 0,12	3,16 ± 0,75
CP	ciclofosfamida	0,53* ± 0,11	15,33* ± 4,22
CP		0,53* ± 0,11	15,33* ± 4,22

ANOVA One-way com pós teste de tukey. CN: controle negativo (água); CP: Controle positivo (ciclofosfamida 50mg/kg); MN: Micronúcleo; *: significante em relação ao CN. p < 0,05.

A partir dos resultados obtidos para o aromatizante de Uva, verifica-se que as duas doses avaliadas induziram a formação de número significativo de micronúcleos nas células de sangue periférico e de medula óssea do organismo de prova utilizado, mostrando-se, nestas condições de estudo, citotóxicas e mutagênicas. Já para o aditivo de Ameixa, observa-se que as doses testadas somente induziram micronúcleos nas células de medula óssea, mostrando por meio deste sistema teste, potencial tóxico em nível celular.

Apesar de serem escassos os estudos sobre a toxicidade em nível celular de microingredientes aromatizantes, são encontrados na literatura científica trabalhos que demonstraram citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns dos constituintes químicos com ações diluentes e conservante que fazem parte, de acordo com Resolução RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007 (BRASIL, 2007), da formulação dos aditivos de aroma e sabor em geral. Entre estes constituintes químicos está o álcool benzoico, compostos responsável por manter a uniformidade e facilitar a incorporação e dispersão dos aromas nos produtos alimentícios. Em análise a ação em nível celular deste diluente, Demir et al. (2010) verificaram que este álcool promoveu danos significativos ao fuso mitótico, e, conseqüentemente, a divisão celular de células de sangue periférico humano.

Outro diluente encontrado na formulação dos aromatizantes é o diacetil (2,3-butadiona). Whittaker et al. (2008) citam que este composto em ensaio de mutação gênica em linfoma de ratos causou danos significativos ao loci do cromossomo 11 destas células, causando perda de expressão dos genes para enzima timidina-quinase. Ainda, More et al. (2012) verificaram que o diluente diacetil teve o potencial de substituir bases de timina por guaninas em regiões de eucromatina e ocasionar o rompimento de pontes de hidrogênio e de dissulfeto em estrutura terciária de enzimas envolvidas no processo de divisão celular.

Já entre os constituintes químicos responsáveis em retardar a ação de microrganismos, enzimas e agentes físicos nas soluções de aroma e sabor, estão o benzoato de potássio, benzoato de sódio e nitrato de potássio (BRASIL, 1999), agentes conservantes que, segundo Mpountoukas et al. (2010) e Zequin et al. (2011), foram citotóxicos e genotóxicos a células normais de sangue periférico humano. Na composição dos aromatizantes alimentares também são encontrados os compostos conservantes ácido bórico, ácido cítrico, citrato de potássio e citrato de sódio (BRASIL, 1999) que, de acordo Tükoğlu (2007), acarretaram redução significativa ao índice de divisão celular de células de meristemas de raízes de *A. cepa*, mostrando-se citotóxicos.

Também é importante citar que na formulação dos aromatizantes alimentares, a única classe de compostos que possui restrição de uso normatizada pelos órgãos de segurança alimentar é a de solventes de extração, onde o ácido agárico, aloina, beta-azorona, berberina, cumarina, ácido cianídrico, hipericina, pulegona, quassina, safrol e isosafrol, santonina e tuyona alfa e beta possuem limites máximos toleráveis discriminados em documento (BRASIL, 1999; BRASIL, 2007). No entanto, na composição dos aromatizantes em geral, 11 são as classes de compostos químicos encontradas, onde cada uma é formada, em média, por

20 compostos químicos, e no qual a maioria não foi avaliada ainda quanto aos seus potenciais citotóxicos e genotóxicos.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, para os aditivos de Uva e Ameixa, juntamente com as pesquisas de avaliação da toxicidade em nível celular sobre compostos presentes na formulação dos aromatizantes alimentares já realizadas, verifica-se que, embora a utilização dos aromatizantes alimentares seja permitida pela EFSA, FEMA e ANVISA, há urgente necessidade de estudos mais detalhados, a médio e longo prazo, em diferentes sistemas teste, dosagens e tempo de exposição, para aí se determinar com propriedade a toxicidade em nível celular destas substâncias e/ou das classes de compostos químicos que as constituem e, dessa forma, assegurar a utilização e consumo segura destas substâncias pela população.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Procedimentos para a indicação do uso de aroma na rotulagem de alimentos.** Informe técnico nº 26, de 14 de julho de 2007.
- ANTUNES, L. M. G; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos . **Rev. Nutr**, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.
- AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGOND, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 2011.
- AZEVEDO, Fausto Antônio de. Toxicologia do mercúrio. In: **Toxicologia do mercúrio.** RIMA/INTERTOX, 2003.
- AZEVEDO, L. C., SILVA, M. C. A., MARTINS, A. D. A., Souza, D. G. Avaliação do comportamento de acidulantes em diferentes tecidos vegetais. In V CONNEPI-2010.
- 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. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. Bioquímica médica. 1ªed. São Paulo: **Manole**, 2000.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C.; Oga, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Avaliação da toxicidade. **Fundamentos de Toxicologia.** São Paulo: Ed. Atheneu. p.59-70, 2008.
- BENDINO, N. I.; POPOLIM, W. D.; OLIVEIRA, C. R. A. Avaliação do conhecimento e dificuldades de consumidores frequentadores de supermercado convencional em relação à rotulagem de alimentos e informação nutricional. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 3, p. 261-265, 2012.
- BOSQUESI, P. L.; ALMEIDA, A. E. D.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; SANTOS, J. L. D.; CHIN, C. M. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 231-238, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visa Legis. **Resolução RDC n.2, de 15 de janeiro de 2007.** Aprova a “Resolução da Diretoria Colegiada que aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes, que consta como anexo da presente Resolução”. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.htm> acesso em: 17/11/2014.
- CÂMARA, S. A. V. **Fatores de risco para câncer de estômago: Avaliação dos teores de nitrato e nitrito em linguças.** 2006. 106f. Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. 2006.
- CARVALHO, P. R. Aditivos dos Alimentos. **Revista Logos**, São Paulo, n. 12, pp. 57 -69, 2005.
- DEMIR, E.; CARY, M. P.; PALEY, S., FUKUDA, K., LEMER, C.; VASTRIK, I.; SCHACHERER, F. The BioPAX community standard for pathway data sharing. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 935-942, 2010.

FENG, J.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, H. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 568-586, 2011 v. 1, n. 4, p. 568-86, 2011.

GOMES, K. M. S.; OLIVEIRA M. V. G. A.; CARVALHO F. R. S.; MENEZES, C. C.; PERON A. P. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatzarine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Cienc Tecnol Aliment**. 2013;33:218-23.

HONORATO, T. C. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista verde de agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 01-11, dezembro, 2013.

HONORATO; T.C.; NASCIMENTO, K.O. Conhecimento do consumidor em relação aos aditivos utilizados na produção e conservação dos alimentos. **Nutrição Brasil**, v.10, n.1, jan./fev., 2011.

KOCA, N.; ERBAY Z.; KAYMARK-ERTEKIN, F. Effects of spray-dripping conditions on the chemical, physical and sensory properties of cheese powder. **J. Dairy Sci.**, 2015; 98; 2934-2943. DOI: 10.3168/jds.2014-9111.

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

LERNER, C. A.; SUNDAR, I. K.; YAO, H.; GERLOFF, J.; OSSIP, D. J.; MCINTOSH, S.; ROBINSON, R.; RAHMAN, I. Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. **journal.pone** 6:10, 2015. doi: 10.1371/.

LOUZADA, M. L., C.; MARTINS, A. P. B., CANELLA, D. S., BARALDI, L. G., LEVY, R. B., CLARO, R. M.; MONTEIRO, C. A. Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saúde pública**, v. 49, p. 00-00, 2015.

LIMA, A. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; ABRAHÃO, S. A.; DUARTE, S. M. D. S., & PAULA, F. B. D. A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Revista Quím Nova**, v. 33, n. 1, p. 20-24, 2010.

LIMA, G. F. ADITIVOS ALIMENTARES: DEFINIÇÕES, TECNOLOGIA E REAÇÕES ADVERSAS. **Veredas Favip-Revista Eletrônica de Ciências**, v. 4, n. 2, 2013.

LORENZONI, A. S. G. Aditivos presentes em alimentos para o público infantil comercializados no Brasil. 2011. 32f. (Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LUERCE, R. F. **Produção de acetoina por *Bacillus polymyxa***. 2008. 83f. Programa (Mestre em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MARQUES, G. S.; SILVA, S. I. O.; SOUSA, J. M. C.; FERREIRA, P. M. P.; PERON. A. P.; Cytotoxicity and mutagenic potential of liquid synthetic food flavoring evaluated individually and in association. **Food Sci Technol**. 2015;35:183-88. DOI: 10.1590/1678-457x.6596.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I., KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, v. 88, p. 515-1531, 2006.

MOODIE, R.; STUCKLER, D.; MONTEIRO, C.; SHERON, N.; NEAL, B.; THAMARANGSI, T. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. *Lancet*, 2013;381:670-79. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62089-33031.

MORE, S. S.; RAZA, A.; VINCE, R. (2012). The butter flavorant, diacetyl, forms a covalent adduct with 2-deoxyguanosine, uncoils DNA, and leads to cell death. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:3311-17. DOI: 10.1021/jf300180.

MPOUNTOUKAS, P., PANTAZAKI, A., KOSTARELI, E., CHRISTODOULOU, P., KARELI, D., POLILIOU, S.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 10, p. 2934-2944, 2010.

OLIVEIRA, M. V. A., ALVES, D. D. L., LIMA, L. H. G.M., CASTRO, J. M.; PERON, A. P. Citotoxicidade dos corantes alimentares erythrosine (E-127), azul brilhante (E-133) e red 40 (E-129) em sistema-teste vegetal. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 35(4), 557-562, 2013.

PIERCE, J.S.; ABELMANN, A.; SPICER, L. J.; ADAMS, R. E.; FINLEY, B.L. Diacetyl and 2,3-pentanedione exposures associated with cigarette smoking: implications for risk assessment of food and flavoring workers. *Crit Rev Toxicol.* 2014;44:420-35. doi: 10.3109/10408444.2014.882292.

PIMENTEL, L. C. F., CHAVES, C. R., FREIRE, L. A. A., AFONSO, J. C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. *Revista Química Nova*, v.29, n.5, p.1138-1149, 2006.

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

REZENDE, S.; NASCIMENTO, D. ; PIOCHON, E. **Educação alimentar: aditivos alimentares encontrados nos sucos consumidos pelos acadêmicos do curso de ciências biológicas de Jataí - GO.** In: Anal do Congresso de Pedagogia. Jataí; 2008.

REZENDE, O.S.J.; PALHAES, L. B.; CUNHA, L. C. **Intoxicações por plantas tóxicas notificadas no CIT-Centro de Informação Toxicológica de Goiás no período de 2001 a 2005.** Monografia de Especialização-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2006.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Editora da ULBRA, Edição Única, P. 173-198, 2003.

SALINAS, R. D. Alimentos e Nutrição: Introdução à Bromatologia. 3ªEd. Porto Alegre: Artmed, 2002. RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Editora Ulbra. Canoas, 1ª ed., 2003.

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

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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v.519, p.103-119, 2002.

TONETTO, A., HUANG, A., YOKO, R., GONÇALVES, R., FBT, D., SAAD, S. M. I., Oliveira, M. N. O uso de aditivos de cor e sabor em produtos alimentícios. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2008.

TORRES, E.A.F.S.; MACHADO, F.M.S. **Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns**. São Paulo: Ponto Crítico, 2001.

TURKOGLU, A., DURU, M. E., MERCAN, N., KIVRAK, I., GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 267-273, 2007.

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

VALADARES, M.C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

VARELA, P.; FISZMAN, S. M. Exploring consumers' knowledge and perceptions of hydrocolloids used as food additives and ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n.1, p. 477-484, Jan. 2013.

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

WHITTAKER, Robert J.; TRIANTIS, Kostas A.; LADLE, Richard J. A general dynamic theory of oceanic island biogeography. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 6, p. 977-994, 2008.

XU, Yuhuan. *Ferroelectric materials and their applications*. **Elsevier**, 2013.

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

ZAINEDDIN, A. K., BUCK, K., VRIELING, A., HEINZ, J., FLESCHE-JANYS, D., LINSEISEN, J., CHANG-CLAUDE, J. The association between dietary lignans, phytoestrogen-rich foods, and fiber intake and postmenopausal breast cancer risk: a German case-control study. **Nutrition and cancer**, 64(5), 652-665, 2012.

ZEQUIN, N.; YÜZBAŞIOĞLU, D.; UNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. **Food Chem Toxicol**. 2011;49:763-69. DOI: 10.1016/j.fct.2010.11.040.

ZILIFDAR, F.; ALPES-HAYTA, S.; YILMAZ, S.; KAPLAN-ORZEN, C.; FOTO, E.; AYDOGAN, N.. Genotoxic potential and eukaryotic DNA topoisomerase inhibitory effects of some benzoxazine derivative. **Medicinal Chemistry Research**, 23 (1), 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, Jamaina Barbosa Silva,
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
Avaliação da toxicidade de aditivos alimentares sintéticos em células
de medula óssea e sangue caudal de camundongos Mus musculus L.
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 29 de julho de 2016

Jamaina Barbosa Silva

Assinatura

Jamaina Barbosa Silva

Assinatura