



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DETERMINAÇÃO DE IMPACTOS CELULARES E SISTÊMICOS DE  
ADITIVOS ALIMENTARES DE AROMA E SABOR USANDO MODELOS  
LABORATORIAIS *in vitro* E *in vivo*: ENFOQUE TOXICOLÓGICO,  
FISIOLÓGICO E NUTRICIONAL**

**NÁRCIA MARIANA FONSECA NUNES**

**Teresina – Piauí  
2018**

NÁRCIA MARIANA FONSECA NUNES

**DETERMINAÇÃO DE IMPACTOS CELULARES E SISTÊMICOS DE  
ADITIVOS ALIMENTARES DE AROMA E SABOR USANDO MODELOS  
LABORATORIAIS *in vitro* E *in vivo*: ENFOQUE TOXICOLÓGICO,  
FISIOLÓGICO E NUTRICIONAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**Teresina – Piauí  
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde  
Serviço de Processamento Técnico

Nunes, Nárcia Mariana Fonseca.  
N972d      Determinação de impactos celulares e sistêmicos de aditivos alimentares de aroma e sabor usando modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* : enfoque toxicológico, fisiológico e nutricional / Nárcia Mariana Fonseca Nunes. -- Teresina, 2018.  
143 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.  
“Orientação : Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira.”  
Bibliografia

1. Legislação. 2. Citotoxicidade. 3. Toxicidade aguda. 4. Efeitos digestórios. 5. Ação central. I. Título.

CDD 664

NÁRCIA MARIANA FONSECA NUNES

**DETERMINAÇÃO DE IMPACTOS CELULARES E SISTÊMICOS DE  
ADITIVOS ALIMENTARES DE AROMA E SABOR USANDO MODELOS  
LABORATORIAIS *in vitro* E *in vivo*: ENFOQUE TOXICOLÓGICO,  
FISIOLÓGICO E NUTRICIONAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Data: 19/02/2018**

**BANCA EXAMINADORA**



**Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Orientador)**

Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI



**Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Co-orientador)**

Departamento de Ciências Biológicas

*Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros – UFPI



**Dra. Marcília Pinheiro da Costa (Membro Interno)**

Departamento de Farmácia – UFPI



**Dr. Carlos Manuel Dutok Sánchez (Membro Externo)**

Departamento de Enfermagem – *Campus* Binacional – UNIFAP

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

**PRÓ-REITOR DE ENSINO EM PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS**

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

## AGRADECIMENTOS

### **A Deus**

Pelo seu amor incondicional! E mesmo sendo infinitamente grande, poderoso e santo se importa comigo que sou tão pequena e limitada e se inclina ao meu favor me sustentando em todo o tempo. Toda conquista, glória e honra a TI entrego.

### **A minha preciosa família**

Meus pais, Antônio Luis e Socorro Fonseca, presente de Deus na minha vida, por todo esforço, amor e carinho. Às minhas irmãs Stefânia Thais e Sofia Fonseca por serem amigas, pelo companheirismo, incentivo, cuidado e carinho.

A **Universidade Federal do Piauí** através do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela possibilidade de concretização de mais um desafio.

### **Ao orientador Dr<sup>o</sup> Paulo Michel Pinheiro Ferreira**

Pela confiança, dedicação, cobranças, críticas e sugestões que foram fundamentais para a concretização desta dissertação. Excelente orientação! Muito obrigada!

### **Aos professores colaboradores**

À professora **Dr. Ana Paula Peron** da Universidade Federal do Piauí (UFPI) no Campus Helvídio Nunes Barros pela parceria com os estudos antitumorais. Ao professor **Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior** e a **Dra. Antônia Maria das Graças Citó**, e os seus orientandos **Edymilaís da Silva Sousa** e **Maria das Dores Alves**, pela colaboração na caracterização da amostra do aromatizante de manteiga, sendo importante para a realização desta Dissertação. À **Deise e Profa. Cláudia** da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela parceria com os testes de citotoxicidade.

### **Aos amigos dos Laboratórios**

De Cancerologia Experimental (LabCancer<sup>TM</sup>) pela convivência e por sempre estarem dispostos a ajudar, Jurandi Silva, José Roberto, Kátia Machado, Livia Queiroz, Lara, Carla Lorena, Ian Dhemes. Aos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Genética (LAPGENIC), Ana Maria, Tonny Lima, Ag-Anne, Rai Pablo, José Victor, Marcus Vinícius, pela colaboração. Demonstro aqui minha gratidão, pois sem o conhecimento, esforço, ajuda e o empenho de vocês esse trabalho não teria sido possível.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF**, da Universidade Federal do Piauí pela dedicação e incentivo. E agradeço também, aos membros da **Banca de Qualificação e de defesa da Dissertação** pela disposição em colaborar com o aperfeiçoamento desse estudo, através de importantes críticas e sugestões.

**Aos funcionários que prestam serviços no Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI, pelo auxílio durante a execução desta pesquisa.**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES** pelo prezado apoio financeiro.

**Para sempre minha gratidão.**

***“O lugar mais alto que uma pessoa pode estar na vida é aos pés de Jesus”. Humildade e dependência.***  
(Hernandes Dias Lopes)



NUNES, N. M. F. **Determinação de impactos celulares e sistêmicos de aditivos alimentares de aroma e sabor usando modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo*: enfoque toxicológico, fisiológico e nutricional.** Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, 2018. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

## RESUMO

Os aditivos alimentares apresentam importância tecnológica na indústria de alimentos. Contudo, há poucas pesquisas quanto às propriedades toxicológicas em nível celular e sistêmico. Diante disto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade citogenotóxica *in vitro* de aromas alimentares sintéticos idênticos ao natural, identificar os constituintes do aromatizante de manteiga e alterações toxicológicas *in vivo*. Para tanto, uma revisão de literatura foi realizada a respeito do uso, legislação, bem como os riscos de classes de aditivos utilizando banco de dados. Foram realizadas a avaliação da citogenotoxicidade em células de *Allium cepa* e tumorais humanas (ensaio MTT) e em culturas primárias de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e murinos com o ensaio de Alamar blue dos aromas sabor de manteiga, queijo cheddar e cebola. Por fim, identificação dos constituintes do aromatizante sabor manteiga (AM) e avaliação da citotoxicidade frente à *Artemia salina* e em células normais humanas de fibroblasto de pulmões (MRC-5) por Alamar blue, seguido de estudo toxicológico em dose única observando parâmetros gerais de comportamento por *screening* hipocrático, taxa de letalidade e estimativa da DL50, assim como avaliação da atividade exploratória, coordenação motora e ansiedade por meio dos testes de campo aberto, barra giratória e labirinto em cruz elevada, respectivamente do AM. Foi possível constatar um considerável número de publicações mostrando as diversas formas de uso, legislações nacionais e internacionais e atividades toxicológicas em nível celular e sistêmico das principais classes de aditivos. Os aromas sabor de manteiga, queijo cheddar e cebola demonstraram efeito citogenotóxico com diferenças significativas quando comparado ao controle em todos os testes ( $p < 0,05$ ). Os resultados por CG-MS demonstraram que os constituintes presentes no AM foram butanoato de etila (97,75 %), 2,3-butanodiona (1,51%), Ácido butanoico (0,39) e hexanoato de etila (0,35%). Em 24 horas o AM revelou  $CL_{50}$  14,7(13,7-15,7) mg/mL revelando-se não citotóxico aos náuplios. Na avaliação da atividade citotóxica de MRC-5 observou-se  $Cl_{50} > 50$  µg/mL, revelando atóxico às células. Na toxicidade aguda *in vivo*, observou-se morte em todas as doses testadas o que foi possível estimar a DL50  $> 30-300$  mg/kg inclindo-se na categoria 3 de acordo a *Globally Harmonised System* (GHS). Os resultados do *Screening* hipocrático mostraram a ausência de mortalidade no 1º dia analisado e presença de sinais clínicos sugestivos de toxicidade, e alterações comportamentais exploratórias e motoras. Na análise do efeito do AM no trato gastrointestinal observou-se aumento percorrido pelo carvão ativado e consequentemente diminuição do peso relativo ( $p > 0,05$ ). Portanto, os aromas estudados revelou efeitos de toxicidade à nível celular e sistêmico em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Legislação. Citotoxicidade. Toxicidade aguda. Efeitos digestórios. Ação central.

NUNES, N. M. F. **Determination of cellular and systemic impacts of flavor and flavor food additives using in vitro and in vivo laboratory models: toxicological, physiological and nutritional approach.** Supervisor: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, 2017. Dissertation, Post-graduation Program Pharmaceutical Sciences, Nucleus of Pharmaceutical Technology, Federal University of Piauí, Teresina.

## **ABSTRACT**

Food additives are technologically important in the food industry. However, there is little research on toxicological properties at the cellular and systemic levels. Therefore, the objective of this study was to evaluate the in vitro cytotoxic activity of synthetic food flavorings identical to the natural one, to identify the constituents of the butter flavoring and toxicological changes in vivo. To do so, a literature review was conducted regarding the use, legislation, as well as the risks of additive classes using database. Cytotoxicity was evaluated in *Allium cepa* and human tumor cells (MTT assay) and primary cultures of murine peripheral blood mononuclear (PBMC) cells with the Alamar blue assay of butter, cheddar and onion flavor aromas. Finally, identification of flavor butter flavoring (AM) constituents and evaluation of cytotoxicity against *Artemia salina* and in normal human lung fibroblast cells (MRC-5) by Alamar blue, followed by a single dose toxicological study observing general parameters of hip ratio screening, lethality rate and LD50 estimation, as well as assessment of exploratory activity, motor coordination and anxiety through the open field, turntable and high cross maze tests, respectively. It was possible to observe a considerable number of publications showing the different forms of use, national and international legislation and toxicological activities at the cellular and systemic level of the main classes of additives. The flavor aromas of butter, cheddar and onion showed a cytotoxic effect with significant differences when compared to the control in all the tests ( $p < 0.05$ ). The results by GC-MS showed that the constituents present in the AM were butanoate of ethyl (97.75%), 2,3-butanone (1.51%), butanoic acid (0.39) and ethyl hexanoate (35%). In 24 hours AM revealed LC50 14.7 (13.7-15.7) mg / mL and it was non-cytotoxic to nauplii. In the evaluation of the cytotoxic activity of MRC-5, IC 50 > 50  $\mu\text{g/mL}$  was observed, revealing non-toxic to cells. In acute toxicity in vivo, death was observed at all doses tested, which was possible to estimate LD50 > 30-300 mg/kg by falling into category 3 according to Globally Harmonized System (GHS). The results of the Hippocratic Screening showed the absence of mortality on the 1st day analyzed and the presence of clinical signs suggestive of toxicity, and exploratory and motor behavioral changes. In the analysis of the effect of AM on the gastrointestinal tract, an increase was observed in activated carbon and consequently a decrease in relative weight ( $p > 0.05$ ). Therefore, the flavors studied revealed toxicity effects at the cellular and systemic levels in experimental models in vitro and in vivo.

**KEYWORDS:** Legislation. Cytotoxicity. Acute toxicity. Digestive effects. Central action.

## LISTAS DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1** - Representação esquemática do levantamento bibliográfico entre 1986 a 2017.

**Figura 2** - Resumo dos órgãos reguladores e critérios de avaliação responsáveis pela segurança dos aditivos alimentares.

**Figura 3** - Representação esquemática da classificação dos aditivos alimentares.

**Figura 4** - Mecanismo geral de reações alérgicas causadas por aditivos alimentares, como o carmin.

**Figura 5** - Metabolismo do benzoato de sódio na mitocôndria.

**Figura 6** - Conversão de compostos de nitratos e nitritos em N-nitrosamidas.

**Figura 7** - Mecanismo mais comum de formação de metahemoglobina pela interação com nitratos e nitritos.

**Figura 8** - Mecanismo geral da toxicidade do flavorizante L-Glutamato de Sódio.

**Figura 9** - Danos sistêmicos a camundongos causados por edulcorantes.

**Figura 10** - Interação do DA ao DNA causando adutos.

**Figura 11** - Estrutura molecular do maltol e do etil maltol.

### CAPÍTULO 2

**Figura 1** - Aberrações celulares e anormalidades do fuso mitótico causadas pelo aromatizante sabor de cebola em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* após 24 h e/ou 48 h de tratamento.

### CAPÍTULO 3

**Figura 1** - Perfil cromatográfico do aromatizante sabor de manteiga por realizado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) e determinado com luz UV em comprimento de onda de 230 nm.

**Figura 2** - Viabilidade do microcrustáceo *Artemia salina* L. (CL<sub>50</sub>) após 24 h de exposição ao aromatizante sador de manteiga.

**Figura 3** - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meyer de camundongos *Swiss* fêmeas tratadas com dosagem única do aromatizante sabor manteiga via oral por gavagem.

**Figura 4** - Efeitos do aromatizante sabor manteiga sobre o número de cruzamentos, autolimpeza e levantamentos após a administração única via oral por gavagem em camundongos *Swiss*.

**Figura 5** - Avaliação do trânsito intestinal e do peso relativo do intestinal delgado de camundongos adultos *Swiss* tratados com o aromatizante sabor manteiga com dose única via oral por gavagem.

## LISTAS DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1** - Classes, exemplos, IDA e possíveis efeitos dos aditivos alimentares mais usados.

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1** - Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos aromatizantes sabores de cebola, cheddar e manteiga em linhagens cancerosas humanas por ensaio de MTT e na cultura primária de células de Sarcoma 180 (S180) e em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) quantificadas pelo teste de Alamar Blue após 72 h de incubação.

**Tabela 2** - Número total de células analisadas no ciclo celular do meristema de raiz de *Allium cepa* após tratamento com 1 e 2 mL do aromatizante sabor de manteiga nos tempos de exposição de 24 e 48 h.

**Tabela 3** - Número total de células analisadas no ciclo celular do meristema de raiz de *Allium cepa* após tratamento com 1 e 2 mL do aromatizante sabor cheddar nos tempos de exposição de 24 e 48 h.

**Tabela 4** - Número total de células analisadas no ciclo celular do meristema de raiz de *Allium cepa* após tratamento com 1 e 2 mL do aromatizante sabor de cebola nos tempos de exposição de 24 e 48 h.

**Tabela 5** - Número de pontes na anáfase e telófase, células micronucleadas, c-metáfase, ampliações e o número total de aberrações cromossômicas em cada controle e em doses de 1 e 2 mL do aroma sabor de cebola.

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1** - Efeitos tóxicos agudos do aromatizante sabor manteiga após a administração oral por gavagem em camundongos adultos *Swiss*.

**Tabela 2** - Efeitos do aromatizante sabor manteiga sobre a coordenação motora de camundongos *Swiss* após a administração única via oral por gavagem avaliados pelo teste *rota rod*.

**Tabela 3** - Efeitos do aromatizante sabor manteiga sobre o comportamento exploratório de camundongos *Swiss* após a administração única via oral por gavagem avaliados pelo teste labirinto em cruz elevada.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A** Anáfase

**AMP** Adenosina Monofosfato

**AM** Aromatizante ou Aroma de manteiga

**ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AO** Antioxidante

**ATP** Adenosina Trifosfato

**BFA** Brefeldina A

**CA** *Codex Alimentarius*

**CAC** Comissão do *Codex Alimentarius*

**Ca<sup>2+</sup>** Cálcio

**Caco-2** Carcinoma humano de cólon

**CaCl<sub>2</sub>** Cloreto de cálcio

**CEEA** Comitê de Ética em Experimentação Animal

**C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>** 2,3-butanodiona

**C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>** Maltol

**CL<sub>50</sub>** *Concentração letal de 50%*

**CoA** *Coenzima A*

**COBEA** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**DL<sub>50</sub>** Dose letal de 50%

**DMSO** Dimethyl sulfoxide

**DNA** *Deoxyribonucleic Acid*

**EFSA** *European Food Safety Authority*

**FAO** *Food and Agriculture Organization*

**FDA** *Food and Drug Administration*

**FDCA** *Food, Drug and Cosmect Act*

**Fe<sup>2+</sup>** Íon Ferroso

**Fe<sup>3+</sup>** Íon Férrico

**FEMA** *Flavor and Extract Manufacturers Association*

**GC-MS** *Gas chromatography – mass spectrometry*

**GRAS** Generally recognized as safe

**GSFA** *General Standards for Food Additives*

**GSH** Glutathiona

**HCT-116** Carcinoma de cólon humano  
**HEK-293** Células embrionárias renais humanas  
**HL-60** Carcinoma de leucemia promielocítica  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrogênio  
**HT-29** Carcinoma humano de cólon  
**IC<sub>50</sub>** 50% da concentração inibitória  
**IDA** Ingestão Diária Aceitável  
**IFN- $\gamma$**  Interferon gamma  
**IgE** Imunoglobulina  
**IL** Interleucina  
**IM** Índice Mitótico  
**INS** *International Numbering System*  
**IPCS** Programa Internacional de Segurança Química  
**IR** Índice de retenção  
**JECFA** *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*  
**KCl** Cloreto de potássio  
 **$\alpha$ -KGDH** *alpha-ketoglutarate dehydrogenase*  
**LabCancer** Laboratório de Cancerologia Experimental  
**L-GS** L- Glutamato de Sódio  
**LPS** Lipopolissacarídeo  
**MgSO<sub>4</sub>** Sulfato de magnésio  
**MgCl** Cloreto de magnésio  
**MTT** brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium  
**MEC** Matriz extracelular  
**MDA/MB-231** Carcinoma da mama  
**M** Metáfase  
**MetHb** *Methemoglobin*  
**NaNO<sub>3</sub>** Nitrato de sódio  
**NaNO<sub>2</sub>** Nitrito de sódio  
**NMNDA** N-metil-D-aspartato  
**NOAEL** *No Observed Adverse Effect Level*  
**NaCl** Cloreto de Sódio  
**NaHCO<sub>3</sub>** Bicarbonato de Sódio  
**NEBA** Número de entradas nos braços abertos

**NEBF** Número de entradas nos braços fechados

**8-OHdG** 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

**OVCAR-8** Carcinoma de ovário humano

**OH<sup>·</sup>** Radical hidroxila

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** Superóxido

**OECD** *Organisation for Economic Co-operation and Development*

**OMS** *Organização Mundial de Saúde*

**PPi** Pirofosfato

**PBMC** *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

**P** Prófase

**RDC** Resolução da Diretoria Colegiada

**RPMI** Roswell Park Memorial Institute

**ROS** *Reactive Oxygen Species*

**RNS** *Reactive Nitrogen Species*

**SF-295** Carcinoma humano de glioblastoma

**S180** Sarcoma 180

**T** Telófase

**TE** Tempo de Exposição

**TDAH** Transtorno de déficit de atenção com hiperatividade

**TNF- $\alpha$**  *Tumor necrosis factor alpha*

**TR** Tempo de retenção

**TBHQ** Terc-butilhidroquinona

**TPBA** Tempo de permanência nos braços abertos

**TPBF** Tempo de permanência nos braços fechados

**UNEP** Programa Ambiental das Nações Unidas

**$\chi^2$**  Qui-quadrado



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	24
<b>RESUMO</b> .....	26
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	29
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	29
3.2 ADITIVOS ALIMENTARES.....	30
3.3 LEGISLAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL .....	31
3.4 TOXICIDADE GERAL DOS ADITIVOS ALIMENTARES .....	39
3.4.1 CORANTES .....	49
3.4.2 CONSERVANTES .....	52
3.4.3 REALÇADORES DE SABOR .....	57
3.4.4 ANTIOXIDANTES.....	58
3.4.5 EDULCORANTES .....	60
3.4.6 AROMATIZANTES .....	61
3.4.6.1 DIACETIL .....	62
3.4.6.2 MALTOL .....	63
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	80
<b>RESUMO</b> .....	82
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	84
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	85
2.1 PRODUTOS QUÍMICOS .....	85
2.2 ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO <i>in vitro</i> .....	85
2.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA AS LINHAGENS CELULARES TUMORAIS HUMANAS .....	86
2.2.2 AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> NO TUMOR MURINO SARCOMA 180 .....	87

2.2.3 ESTUDO ANTIPROLIFERATIVO EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO PELO ENSAIO ALAMAR BLUE .....	87
2.2.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZ DE <i>Allium cepa</i> .....	88
2.2.4.1 CÉLULAS DE MERISTEMA DE RAIZ PARA ANÁLISE CITOGENÉTICA .....	88
2.2.4.2 PREPARAÇÃO E LEITURA DE LÂMINAS .....	89
2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	89
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>105</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>107</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>110</b>
2.1 MATERIAL UTILIZADO .....	110
2.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	110
2.3 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS HUMANAS NORMAIS .....	110
2.4 TOXICIDADE AGUDA EM <i>Artemia salina</i> LEACH .....	111
2.5 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA <i>in vivo</i> EM CAMUNDONGOS .....	112
2.5.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	113
2.5.1.1 CAMPO ABERTO .....	113
2.5.1.2 ROTA ROD .....	114
2.5.1.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....	114
2.6 TRÂNSITO INTESTINAL .....	114
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	115
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
3.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO.....	115
3.2 TOXICIDADE EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	117
3.2.1 TOXICIDADE EM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	117

3.2.2 TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS .....	119
3.2.3 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS AGUDAS .....	122
3.3 TRÂNSITO INTESTINAL .....	127
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>128</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>138</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A importância dos alimentos para a humanidade é inegável. Embora a necessidade de se alimentar tenha mantido imutável ao longo dos tempos, a forma como consumimos alimentos tem sofrido mudanças profundas (CAROCHO et al., 2015). Essas mudanças estão relacionadas à adição de vários ingredientes aos gêneros alimentícios, os chamados aditivos alimentares, melhorando suas propriedades em conferir; restaurar e/ou reforçar a cor, como os corantes; viabilizar a vida útil dos produtos alimentares através dos conservantes; reforçar o sabor dos alimentos como os realçadores de sabor (KONISHI; HAYASHI; FUKUSHIMA, 2013; CAROCHO et al., 2015; PAULA NETO et al., 2017).

Como qualquer substância destinada ao consumo humano (ou animal), os aditivos alimentares seguem normas de segurança estabelecidas por órgãos reguladores que avaliam e aprovam seu consumo tais como a *European Food Safety Authority* (EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos), *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA - Comitê de Peritos sobre Aditivos Alimentares) da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), fornecendo informações de segurança em específico dos níveis máximos com a Ingestão Diária Aceitável (IDA) e a *Food and Drug Administration* (FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos) e a *Federal Emergency Management Agency* (FEMA - Agência Federal de Gestão de Emergências) dos Estados Unidos utilizando o *Generally Recognized as Safe* (GRS- *Geralmente Reconhecido como Seguro*) para o uso de aditivos alimentares e harmonização dos padrões internacionais e nacionais de alimentos. Os códigos de segurança GRAS e IDA são estabelecidos com base em dados científicos por meio de estudos toxicológicos em órgãos e sistemas (Ex.: fígado, rins, sistema cardiovascular etc.) e em modelos pré-clínicos com análise citotóxica, genotóxica e mutagênica utilizando modelos *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (camundongos) para determinar possíveis efeitos danosos e identificar níveis de efeitos adversos não observados (NEANO) (SASAKI et al., 2002; PICCIN et al., 2009; MPOUNTOUKAS et al., 2010; SOFFRITTI et al., 2010; ZENGIN et al., 2011; MORE et al., 2012; KONISHI; HAYASHI; FUKUSHIMA, 2013; THIAM

et al., 2014; SHARMA, 2015; VAN EYK, 2015; YADAV et al., 2016; PAULA NETO et al., 2017; SJOSTEDT et al., 2017).

Dentre os aditivos que têm ganhado atenção especial estão os aromatizantes. Atualmente, eles são “elementos essenciais” em praticamente todos os produtos alimentícios, quer sejam preparados frescos ou industrializados, apresentam importância organoléptica e garantem estabilidade das características próprias como sabor e odor dos alimentos durante a fabricação e armazenamento, aumentando o interesse e a adesão dos consumidores (MARIOTTO, 2007). A singularidade dessas substâncias, quanto às possibilidades de riscos, está na ausência de definição da IDA embora com *status* GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) e normatização para uso *quantus satis*, não devendo usar altas doses, pois em grandes quantidades os aromatizantes podem causar danos à saúde, embora não haja uma definição de quais doses sejam consideradas elevadas ou mesmo baixas, nem quais aromatizantes causam efeitos tóxicos (BRASIL, 2007; BRASIL, 1999; SALINAS, 2002; POLÔNIO; PERES, 2009).

Embora tenham sido considerados como totalmente inofensivos à saúde, sob o ponto de vista toxicológico e apesar de toda a regulamentação existente, muitos questionamentos tem sido levantados quanto à segurança do emprego de aditivos alimentares, o que implica na constante necessidade de reavaliação e investigação da segurança, uma vez que os aditivos tem sido amplamente consumidos e há relatos (muitos não comprovados) que aditivos sejam os responsáveis pelo surgimento de diversas doenças como cardiometabólicas e neoplásicas (PRADO; GODOY, 2003; POLÔNIO; PERES, 2009; KONISHI; HAYASHI; FUKUSHIMA, 2013).

Diante do exposto, a presente dissertação intitulada “**DETERMINAÇÃO DE IMPACTOS CELULARES E SISTÊMICOS DE ADITIVOS ALIMENTARES DE AROMA E SABOR USANDO MODELOS LABORATORIAIS *in vitro* E *in vivo*: ENFOQUE TOXICOLÓGICO, FISIOLÓGICO E NUTRICIONAL**”, foi estruturada em capítulos com intuito de realizar uma revisão bibliográfica abordando o uso, benefícios e legislação, bem como os riscos das mais importantes classes naturais ou sintéticas de aditivos alimentares (Capítulo 1), avaliar o potencial citotóxico *in vitro* de compostos aromatizantes líquidos salgados em células vegetais, murinos e humanas normais (Capítulo 2) e

fornecer informações quimio-toxicológicas do aromatizante sabor manteiga por análise cromatográfica e estudos *in vivo* (Capítulo 3).

## 2 REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999. **Aprova o Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes/aroma**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. Disponível em: <[http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual\\_aditivos\\_aromatizantes.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual_aditivos_aromatizantes.htm)>. Acesso em: 10 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 05, de 15 de Janeiro de 2007. (2007)**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf)>. Acesso em: 20 de outubro de 2017.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377-399, 2014.

KONISHI, Y.; HAYASHI, S.; FUKUSHIMA, S. Regulatory forum opinion piece: Supporting the Need for International Harmonization of Safety Assessments for Food Flavoring Substances. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 6, p. 949-953, 2013.

MARIOTTO, J. R. **Produção de acetoína e 2,3-butanodiol por *Bacilluspolymyxa***. Dissertação. Florianópolis, 2007.

MORE, S. S.; VARTAK, A. P.; VINCE, R. The butter flavorant diacetyl, exacerbates beta-amyloid cytotoxicity. **Chemical Research Toxicology**, v. 25, n. 10, p. 2083-2091, 2012.

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

PAULA NETO, H. A.; AUSINA, P.; GOMEZ, L. S.; LEANDRO, J. G. B.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. Effects of food additives on immune cells as contributors to body weight gain and immune metabolic dysregulation. **Frontiers Immunology**, v. 8, p. 1478, 2017.

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

PICCIN, J. S.; VIEIRA, M. L. G.; GONÇALVES, J. O.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Adsorption of FD&C Red No. 40 by chitosan: Isotherms analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 1, p. 16-20, 2009.

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

SALINAS, R. D. **Alimentos e nutrição: introdução à bromatologia**. Porto Alegre: Artmed. p. 278, 2002.

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

SHARMA, A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. **Journal of Biomedical Science**, v.22, p.93, 2015.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; MANSERVIGI, M.; TIBALDI, E.; LAURIOLA, M.; FALCIONI, L.; BUA, L. Aspartame administered in feed, beginning pre-natally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 53, n. 12, p. 1197-1206, 2010.

SJOSTEDT, N.; DENG, F.; RAUVALA, O.; TEPPONEN, T.; KIDRON, H. Interaction of Food Additives with Intestinal Efflux Transporters. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 3824–3833, 2017.

THIAM, A.; ZHOU, M.; BRILLAS, E.; SIRÉS, I. Two-step mineralization of Tartrazine solutions: study of parameters and by-products during the coupling of electrocoagulation with electrochemical advanced oxidation processes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 150–151, p. 116-125, 2014.

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.318-27, 2015.

YADAV, A.; KUMAR, A.; DAS, M.; TRIPATHI, A. Sodium benzoate, a food preservative, affects the functional and activation status of splenocytes at non cytotoxic dose. **Food and Chemical Toxicology**, v. 88, p. 40-47, 2016.

ZENGİN, N.; YUZBASIOĞLU, D.; UNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOV, H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 763-9, 2011.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica e genotóxica *in vitro* de aromas alimentares sintéticos idênticos ao natural, identificando os constituintes do aromatizante sabor de manteiga e alterações sistêmicas *in vivo*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica abordando o uso, benefícios, a legislação, bem como os riscos das mais importantes classes naturais ou sintéticas de aditivos alimentares;
- Avaliar a citogenotoxicidade *in vitro* de aromas sintéticos alimentares sabores de manteiga, cebola e queijo cheddar em células vegetais, murinas e humanas (normais e tumorais);
- Identificar o perfil de componentes do aromatizante sabor de manteiga, avaliando a citotoxicidade *in vitro* em fibroblastos normais de pulmão (MRC-5) por meio do teste Alamar blue, verificando a toxicidade frente aos modelos experimentais microcrustáceo *Artemia salina*, determinando a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e verificando a toxicidade em camundongos adultos *Swiss* fêmeas, estimando a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) para determinar sua ação no sistema nervoso central de roedores e relacionadas ao trato gastrointestinal.



## **CAPÍTULO I**

### **“Alimentos Aditivados”: o uso, a regulação e a toxicologia dos aditivos alimentares**

(Previsão de submissão: *Food and Chemical Toxicology – A2*)

## **“Alimentos Aditivados”: o uso, a regulação e a toxicologia dos aditivos alimentares**

Nárcia Mariana Fonseca Nunes<sup>1</sup>, Joilane Alves Pereira Freire<sup>2</sup>, Stella Regina Arcanjo Medeiros<sup>2</sup>, Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Cancerologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Nutrição, *Campus* Senador Helvidio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí, Picos, Piauí, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

## RESUMO

A adição de aditivos alimentares tem sido uma prática comum utilizada na indústria de alimentos. Essa prática tem aumentando devido às mudanças nos padrões dietéticos da sociedade, como o consumo de alimentos industrializados com maior durabilidade e praticidade. Apesar da importância tecnológica, nos últimos anos, houve uma crescente atenção quanto ao uso e segurança de aditivos alimentares em virtude da exposição contínua em quantidades relevantes em diversos alimentos. Portanto, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma revisão sistemática sobre a importância, uso, legislação e toxicidade dos aditivos mais citados na literatura. Foram selecionados documentos dos bancos de dados google scholar, scielo, science direct e pubmed utilizando palavras-chave aditivos alimentares ou food additives e suas correlações com *use* ou uso, *legislation* ou legislação e toxicidade ou *toxicity*. Assim, foram encontrados documentos sobre aditivos alimentares demonstrando a importância do uso, propriedades tecnológicas e normatizações criadas por órgãos fiscalizadores nacionais e internacionais. Dentre as classes de aditivos, vem recebendo atenção do ponto de vista toxicológico os aromatizantes, corantes, conservantes, edulcorantes, realçadores de sabor e antioxidantes por apresentarem relações com alterações em nível celular, em diversos órgãos principalmente do Sistema Gastrointestinal, no Sistema Nervoso Central (SNC) e no Sistema Nervoso Autônomo, como também Hipersensibilidade, Teratogênico, Embriotóxico, Nefrototoxicidade, Hepatotoxicidade, Diabetes tipo II, Bronquiolite obliterante e morte. Embora amplamente utilizado pelos consumidores, com importância para indústria alimentícia e fiscalizados quanto aos riscos à saúde humana por parte dos órgãos reguladores, inúmeras são as publicações que demonstram a relação de toxicidade com algumas classes de aditivos alimentares, o que exige, constantemente, o aperfeiçoamento das ações sanitárias de controle alimentar visando à proteção à saúde da população e a atualização de regulamentos técnicos sobre uso e limites diários dos aditivos alimentares. Portanto, essa revisão representa uma grande relevância para o desenvolvimento de pesquisas referente aos aditivos alimentares, em especial sobre a toxicidade e sua relação com à saúde humana.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aromatizantes. Compostos sintéticos. Fiscalização. Indústria alimentar.

## **ABSTRACT**

The addition of food additives has been a common practice used in the food industry. This practice has been increasing due to changes in dietary patterns in society, such as the consumption of industrialized foods with greater durability and practicality. Despite the technological importance, in recent years, there has been increasing attention on the use and safety of food additives because of continuous exposure in relevant quantities in various foods. Therefore, this work aimed to develop a systematic review on the importance, use, legislation and toxicity of the most cited additives in the literature. We selected documents from google scholar, scielo, science direct and pubmed databases using keywords food additives or food additives and their correlations with use or use, legislation or legislation and toxicity or toxicity. Thus, documents on food additives were found demonstrating the importance of the use, technological properties and standards created by national and international enforcement agencies. Among the classes of additives, flavorings, dyes, preservatives, sweeteners, flavor enhancers and antioxidants have been receiving from the toxicological point of view because they present relations with changes at the cellular level, in several organs mainly of the Gastrointestinal System, in the Central Nervous System ( SNC) and the Autonomic Nervous System, as well as Hypersensitivity, Teratogenic, Embryotoxic, Nephrotoxicity, Hepatotoxicity, Type II Diabetes, Bronchiolitis obliterans and death. Although widely used by consumers, important for the food industry and monitored for risks to human health by regulatory bodies, there are numerous publications demonstrating the toxicity relationship with some classes of food additives, which requires constant improvement of the sanitary actions of alimentary control aiming at the protection to the health of the population and the update of technical regulations on use and daily limits of the food additives. Therefore, this review is of great relevance for the development of research on food additives, especially on toxicity and its relation to human health.

**KEY WORDS:** Aromatizantes. Synthetic compounds. Oversight. Food industry.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos, os aditivos alimentares estão presentes na dieta humana. Nossos antepassados usavam, de forma rústica, cloreto de sódio (sal de cozinha) para conservar carnes e peixes e adicionavam ervas e temperos para melhorar o sabor (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017). De forma quase que retrógrada, essa prática vem se destacando ao longo dos anos e, embora a alimentação *in natura* e orgânica tenha ressurgido para atender às exigências de um público mais preocupado com a saúde a longo prazo, muitos alimentos colocados no mercado passaram a conter cores, sabores, consistências e aromas artificiais cada vez mais atraentes (POLÔNIO, PERES, 2009). E cada vez mais os aditivos naturais e/ou sintéticos têm sido empregados em alimentos, bebidas, fármacos, entre outros, com o propósito de aumentar a sensação de prazer, palatabilidade, a durabilidade e a ingestão de produtos industrializados.

Os avanços tecnológicos alimentares expandiram a disponibilidade de técnicas para conservação e aprimoramento de alimentos e garantiram às indústrias uma diversidade de aditivos alimentares. Para tanto, estes aditivos são normatizados e regulamentados por diversas entidades nacionais e internacionais, com definições, classificações, restrições e critérios no que se refere ao uso, para garantir a segurança quando obedecidas as condições de produção (ALL FLAVORS, 2016). O FDA (*Food and Drug Administration*) é uma dessas entidades internacionais que já autorizou nos Estados Unidos o uso de mais de 3.000 aditivos alimentares (FDA, 2010a).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão especificamente responsável pela elaboração e publicação da legislação que dispõe sobre o uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação. Para tal, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação do alimento. Ao agregar o aditivo ao alimento, ele ou seu derivado poderá ser convertido em componente(s) do alimento (BRASIL, 2009).

Embora se perceba certo rigor na utilização e regulamentação, ainda é perceptível o descuido na fiscalização do uso de aditivos. Portanto, vale aqui destacar que apesar dos benefícios aparentes, muitas são as dúvidas suscitadas quanto à segurança do uso, e alguns estudos identificaram a associação do consumo de determinados aditivos alimentares com maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas cardiometabólicas e neoplásicas (CHEESEMAN, 2012; YADAV et al., 2016). Diante do exposto, torna-se importante a realização de uma revisão sistemática sobre os aditivos alimentares, com enfoque na importância de aplicação para a indústria de alimentos, na toxicidade celular e sistêmica e na legislação nacional e internacional que regulamenta o que ingerimos, o que bebemos e ao que estamos expostos diariamente durante as refeições.

## **2 METODOLOGIA**

No presente estudo realizou-se uma revisão sistemática para o levantamento de dados bibliográficos e de dados secundários específicos. Utilizou-se as bases de dados *Scielo*, *Pubmed*, *Science Direct* e *Google Scholar* para pesquisas de artigos científicos, dissertações e teses, além da busca em sites governamentais para pesquisa de legislação específica nacional e internacional. Com o propósito de selecionar estudos em português e inglês, relevantes para a discussão do tema, foi utilizado para a seleção utilizou-se as palavras-chave: “aditivos alimentares” ou “*food additives*” e/ou correlações com *use* ou uso, *legislation* ou legislação e toxicidade ou *toxicity*.

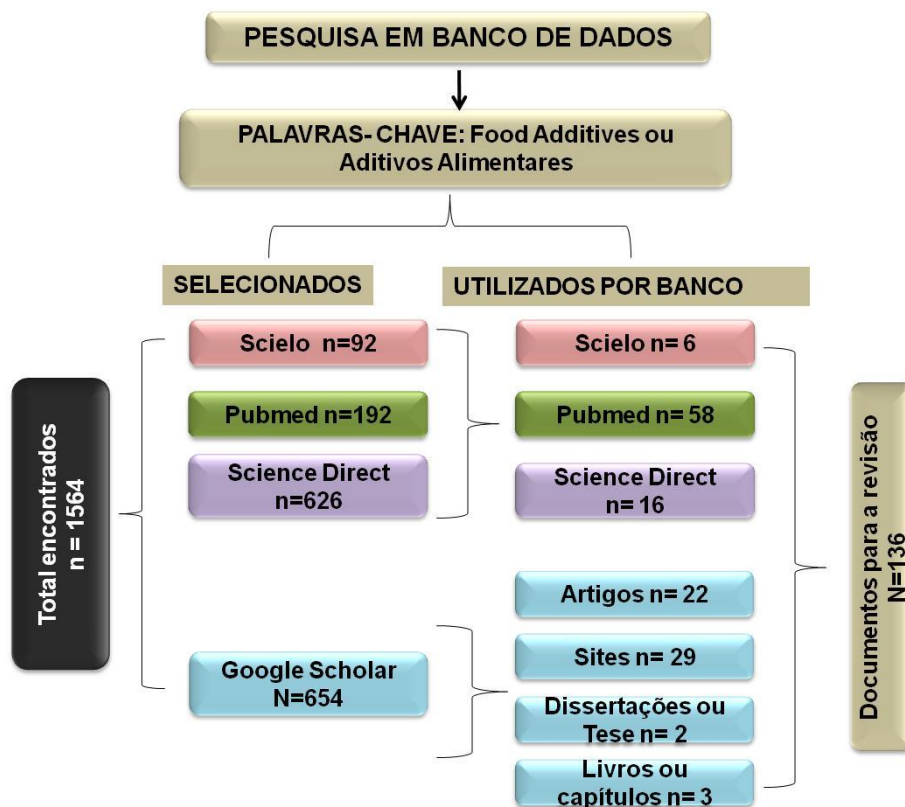
Também foram observados os seguintes critérios de inclusão: resumo e texto completo mostrando uso, classificação, toxicidade e/ou regulamentação dos aditivos alimentares. O período considerado válido para a concepção deste artigo foi de 1984 a 2017. Os dados em duplicidade e não relacionados com os critérios de inclusão foram excluídos.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Levantamento Bibliográfico**

Um total de 1.564 documentos relacionados à temática “aditivos alimentares” foram encontrados, sendo que destes foram utilizados ao total 136

documentos para o desenvolvimento dessa revisão: 102 artigos científicos, sendo 12 em língua portuguesa, 01 em língua espanhola e 89 em língua inglesa, 29 sites incluindo do Ministério da Saúde, Revistas internacionais de Alimentos, Governamentais, 2 dissertações ou tese e 3 capítulos de livros e livros (Figura 1).



**Figura 1** - Representação esquemática do levantamento bibliográfico entre 1984 a 2017.

### 3.2 Aditivos Alimentares

Os aditivos alimentares são substâncias adicionadas aos alimentos intencionalmente sem o objetivo de nutrir, mas de modificar as características dos alimentos e aumentar sua vida útil (BRASIL, 1997). Segundo a FDA, aditivo alimentar é definido como qualquer substância cujo uso pretendido altere direta ou indiretamente as características de qualquer alimento (FDA, 2010a). Mais recentemente, os aditivos tem sido adicionados aos alimentos para desempenhar funções tecnológicas. Por exemplo, com a finalidade de colorir (corantes), adoçar (edulcorantes), ajudar a preservar (conservantes) e/ou conferir sabor e odor (aromatizantes) aos alimentos (EFSA, 2009).

Aditivos veem desempenhando um papel importante e indispensável sob o ponto de vista tecnológico por proporcionar aos alimentos processados condições de preservação durante as etapas de processamento até a sua disponibilidade ao consumidor e evitar alteração nas características organolépticas (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015; SILVA et al., 2016). Obviamente, tais avanços resultam no aumento de alimentos modificados pela adição de mais produtos químicos, sempre com o intuito de melhorar o odor, sabor, cor, textura, propriedade nutricional dos alimentos (KAPTAN; KAYISOGLU, 2015; SAHU, 2017) e o lucro das empresas (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2017), mas tal preferência por “alimentos aditivados” é inata e vinculada às sensações de prazer.

Essa “necessidade” humana por aditivos alimentares tem aumentado devido às mudanças nos padrões dietéticos da sociedade, aderindo cada vez mais por alimentos de maior durabilidade e praticidade e, gradativamente, substituindo os alimentos *in natura* pelos industrializados (KAPTAN; KAYISOGLU, 2015; DALL’AGNOL et al., 2013; POLÔNIO; PERES, 2009). Dentre os gêneros alimentícios industrializados amplamente consumidos pela sociedade que contém aditivos alimentares incluem os produtos lácteos, tofu (queijo japonês), alimentos prontos-a-comer, presunto e linguiça (SHIM; SOON-MI., 2011; LEE, 2009), lanches rápidos, refeições congeladas, sobremesas, enlatados e empanados (SILVA et al., 2015).

Do ponto de vista de legislação internacional e como justificativa para o uso, o emprego dos aditivos alimentares deve ser feito apenas quando for vantajoso por questões de segurança e desempenhar uma ou mais funções tecnológicas, contrariamente do que recentemente vem sendo justificado quanto aos hábitos alimentares como se apenas a aparência e sabor do produto para sua aceitabilidade fossem os motivos reais para o uso (CODEX, 1995; PRADO; GODOY, 2003). Nesse sentido, a segurança dos aditivos alimentares deve ser rigorosamente fiscalizada (PRADO; GODOY, 2003; SAHU, 2017; QIU; WANG, 2017).

### **3.3 Legislação Nacional e Internacional**

O uso dos aditivos alimentares em produtos alimentícios é estritamente controlado por legislações internacionais como o Comitê Misto FAO/OMS de



Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), Organização Mundial de Saúde (OMS), Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), Food and Drugs Administration (FDA) e Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA) dos Estados Unidos. No Brasil, a regulamentação é feita pela Agência Nacional de Vigilância Nacional de Saúde (ANVISA). As normas e regulamentações exigidas pela JECFA, FEMA e EFSA são aceitas por mais de 70 países. A legislação especifica quais substâncias podem ser utilizadas, a fonte, a pureza, em quais alimentos e concentrações podem ser adicionadas (SOMEYA, 2012; KONISHI; HAYASHI; FUKUSHIMA et al., 2013).

O JECFA é um comitê científico especializado e independente que realiza avaliações de riscos dos aditivos alimentares, quanto à identidade e pureza, IDA e IDA não especificada, e atua como um órgão consultivo formado por especialistas responsáveis realizando tal avaliação. É administrado em conjunto pela OMS/FAO prestando assessoria aos países membros de ambas as organizações bem como à Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC) (WHO, 2017).

Para avaliar a segurança dos aditivos alimentares, a JECFA solicita aos órgãos FAO e a OMS uma seleção de membros especialistas. A FAO agrupa-os para elaboração de princípios com o desenvolvimento de especificações como identidade e pureza e a OMS direciona-os às avaliações toxicológicas a fim de estabelecer ingestões diárias aceitáveis (IDAs) ou outros valores de orientação relevante, ou para fornecer uma estimativa quantitativa do risco para a saúde (JECFA, 2001). Para tal, os critérios de avaliação estabelecidos pela JECFA se baseiam em dados científicos bioquímicos e toxicológicos sobre um determinado aditivo, usando testes obrigatórios em animais (agudo, curto e longo prazo), os quais devem possibilitar a identificação da relação causa e efeito entre a digestão, absorção, distribuição e excreção para determinar resposta adversa, como também possíveis efeitos prejudiciais do próprio aditivo ou subprodutos do metabolismo (WHO, 2017).

Ingestão Diária Aceitável (IDA) é a estimativa da quantidade de uma determinada substância que pode ser ingerida à longo prazo e que não cause riscos à saúde humana, podendo variar de alguns miligramas por quilograma de peso corporal (mg/kg de peso corporal) para "*quantum satis*" (quantidade

suficiente), estabelecida com base no *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL - Nível de Efeitos Adversos Não Observados). A partir do NOAEL (em mg/kg/dia) determinado em uma bateria de testes de toxicidade em animais e com base em dados humanos (quando disponíveis), determina-se o nível de IDA por meio da divisão do NOAEL por um fator de segurança, que depende da substância, mas geralmente é utilizado o valor 100, mas esse fator pode ser maior ou menor dependendo da substância em estudo. O NOAEL e os fatores de segurança devem garantir que a IDA seja aplicada a crianças (ou a outras faixas etárias), considerando viável para uso os aditivos que estiverem de acordo aos critérios de salubridade, palatabilidade, armazenamento, transporte e comercialização de alimentos. Anualmente, a JECFA atualiza e estabelece normas de segurança analisando o potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico (ANTUNES; ARAUJO, 2000; WU et al., 2013; BRASIL, 2013).

O Comitê *Codex Alimentarius* (expressão latina e significa Código Alimentar) é um programa composto por 3 órgãos principais: a) Comissão do *Codex Alimentarius* (órgão máximo); b) Secretaria FAO/OMS (e junto com o órgão assessor do JECFA para assessorar) e c) Comitê Executivo, que executa, desde 1963, um programa assessorado pela FAO/OMS sobre normas alimentares, incluindo padrões, diretrizes e guias sobre Boas Práticas e de Avaliação de Segurança e Eficácia a fim de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas legais no comércio de alimentos (BRASIL, 2016).

No âmbito do *Codex Alimentarius*, dentre os órgãos auxiliares existentes, compete ao Comitê Codex de Aditivos Alimentares (CCFA) o desenvolvimento de diretrizes e padrões para estabelecer ou endossar níveis máximos de uso de aditivos (AMCHOVA; KOTILOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015; BRASIL, 2016). Com a finalidade de proporcionar um sistema numérico internacional para identificação de aditivos na lista de ingredientes de alimentos, criou-se o Sistema Numérico Internacional (*International Numbering System* - INS) como uma alternativa ao uso do nome científico, que muitas vezes é longo e complexo (CAROCHO et al., 2014).

Com base nos dados de segurança realizados pelo JECFA, em conjunto à comissão *Codex Alimentarius* (CA) e aos órgãos de normalização dos alimentos FAO/OMS, a OMS impõe o uso dos aditivos alimentares às normas

do banco de dados chamado de Normas gerais para aditivos alimentares (*General Standards for Food Additives - GSFA*), a qual reúne evidências disponíveis da atividade biológica e níveis máximos para uso em alimentos e bebidas. O objetivo dessas normas é harmonizar as regras internacionais no contexto da comercialização mundial de alimentos (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015; WHO, 2017).

Portanto, as normas do *Codex Alimentarius* são referência para implementação de normas nacionais de proteção ao consumidor e para o comércio internacional de alimentos, a fim de que os consumidores se certifiquem dos padrões acordados de segurança e qualidade, independentemente de onde foi produzido (WHO, 2017).

A FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), nos Estados Unidos, é um órgão administrativo que avalia os dados e informações científicas, para garantir que os aditivos alimentares é seguro para seus fins. Qualquer alimento que contenha uma substância não aprovada é considerado adulterado e está sujeito a medidas coercitivas para removê-lo do comércio (FDA, 2016). A FDA se baseia na FEMA junto à Lei de Alimentos, Drogas e Cosméticos (*Food, Drug and Cosmect Act - LADC ou FDCA*), entidades que têm o papel de avaliar os aditivos alimentares, utilizando o *status* GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) publicado com base em dados científicos por um grupo diversificado de pesquisadores nas áreas de Bioquímica, Toxicologia e Medicina de forma a garantir a industrialização e o uso eficaz e seguro de aditivos (SMITH et al., 2005).

Os critérios de avaliação de segurança estabelecidos pela FEMA para divulgação do *status* GRAS de um aditivo alimentar incluem exposição, analogia estrutural, metabolismo, farmacocinética e toxicologia (SMITH et al., 2005). Os resultados das avaliações do GRAS são então publicados em domínio público junto à FDA, às indústrias de alimentos e sabor e ao consumidor (KONISHI et al., 2013). E junto à FDA, os resultados do *status* GRAS são aprovados e classificados (BRASIL, 2007).

De forma geral, observa-se que, embora existam vários comitês, organizações, associações e agências que estabelecem requisitos para avaliação de segurança, as exigências diferem por região, país ou blocos econômicos. Logo, não há padrões de documentação aceitos globalmente,

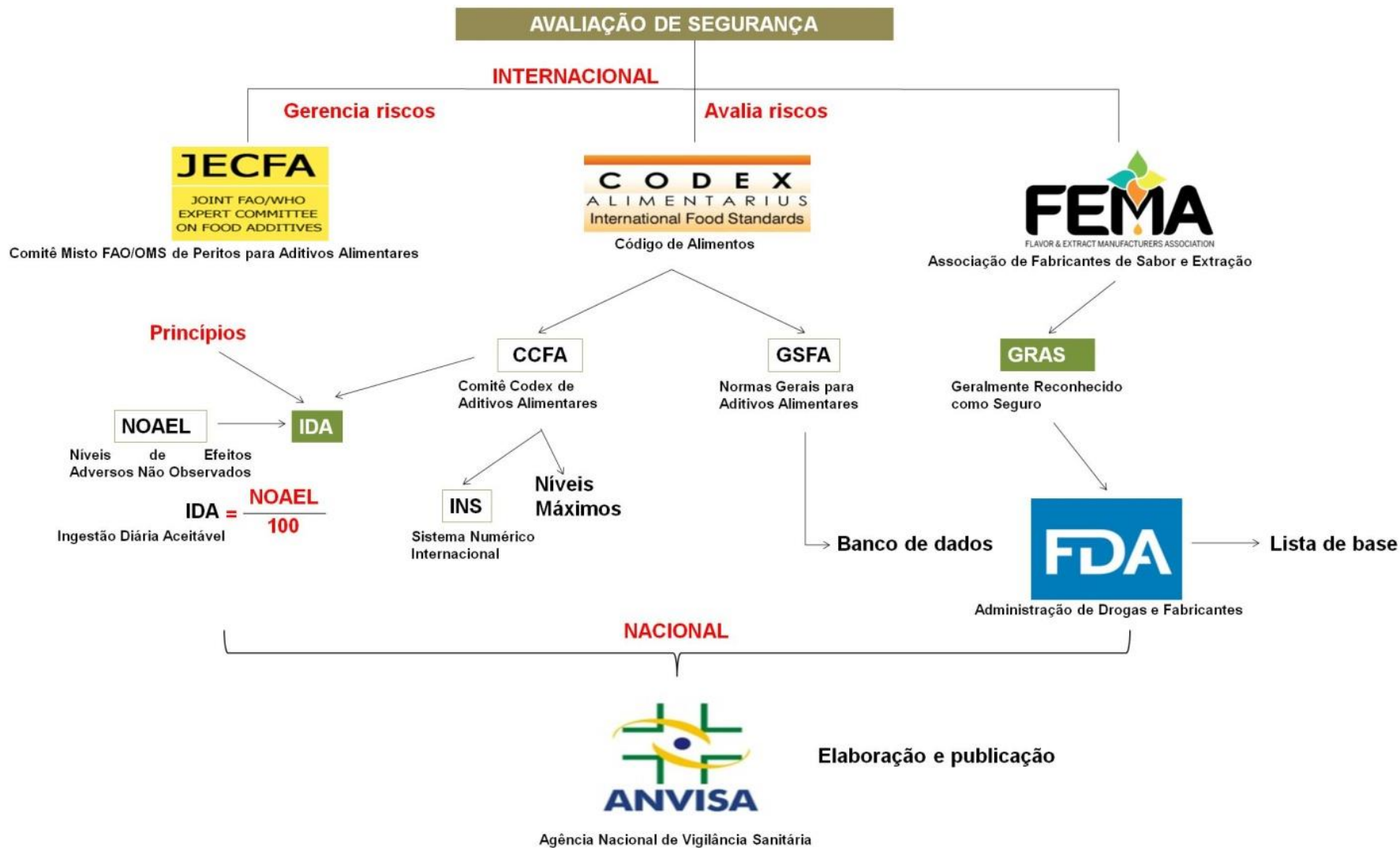
sendo encontradas algumas semelhanças, quase sempre com a finalidade de assegurar o uso seguro e a saúde do consumidor. Evidentemente, é urgente e necessária a harmonização internacional e nacional de abordagens para a avaliação da segurança (KONISHI; HAYASHI; FUKUSHIMA, 2013).

No que se refere à inocuidade, a ANVISA e *Codex Alimentarius* consideram esses compostos inofensivos à saúde desde que obedeçam aos percentuais máximos estabelecidos na IDA (PRADO; GODOY, 2003). Dessa forma, somente os aditivos de fonte natural ou sintéticos que foram submetidos a uma avaliação de segurança do JECFA e que não apresentam risco significativo para a saúde dos consumidores podem ser usados. O uso de aditivos alimentares justifica-se apenas quando esse uso tem uma vantagem, não apresenta um risco considerável para a saúde dos consumidores, não engana o consumidor e serve uma ou mais das funções tecnológicas estabelecidas pelo Codex (WHO, 2017).

Alguns países utilizam informações do JECFA na formulação de seus próprios programas regulatórios, como o Brasil (ANVISA, **Figura 2**), uma vez que poucos países possuem a experiência e os fundos disponíveis para realizar avaliações de risco de produtos químicos em grande quantidade, e todos os países precisam ter acesso às avaliações de risco (JECFA, 2001).

A avaliação dos aditivos alimentares a nível internacional é realizada pela JECFA que gerencia os riscos e estabelece princípios para definir a IDA baseado ao NOAEL junto a CODEX. A CODEX avalia os riscos e define a IDA através da CCFA com base nos níveis máximos. A CCFA identifica cada aditivo de acordo a classe cientificamente com o código INS. As informações IDA e INS são arquivadas ao banco de dados da GSFA. A FEMA estabelece classifica os aditivos de uso seguro ao status GRAS guardados a lista de base da FDA. A ANVISA estabelece e torna pública a legislações próprias conforme as informações estabelecidas pelos órgãos internacionais. JECFA - Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos para Alimentos; CODEX – Código Alimentar; IDA – Ingestão Diária Aceitável; NOAEL - Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis; CCFA - Comitê Codex de Aditivos Alimentares; GSFA - Normas gerais para aditivos alimentares; INS - Sistema Numérico Internacional; FEMA - Associação de Fabricantes de Sabores e Extratos; GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro; FDA – Administração de

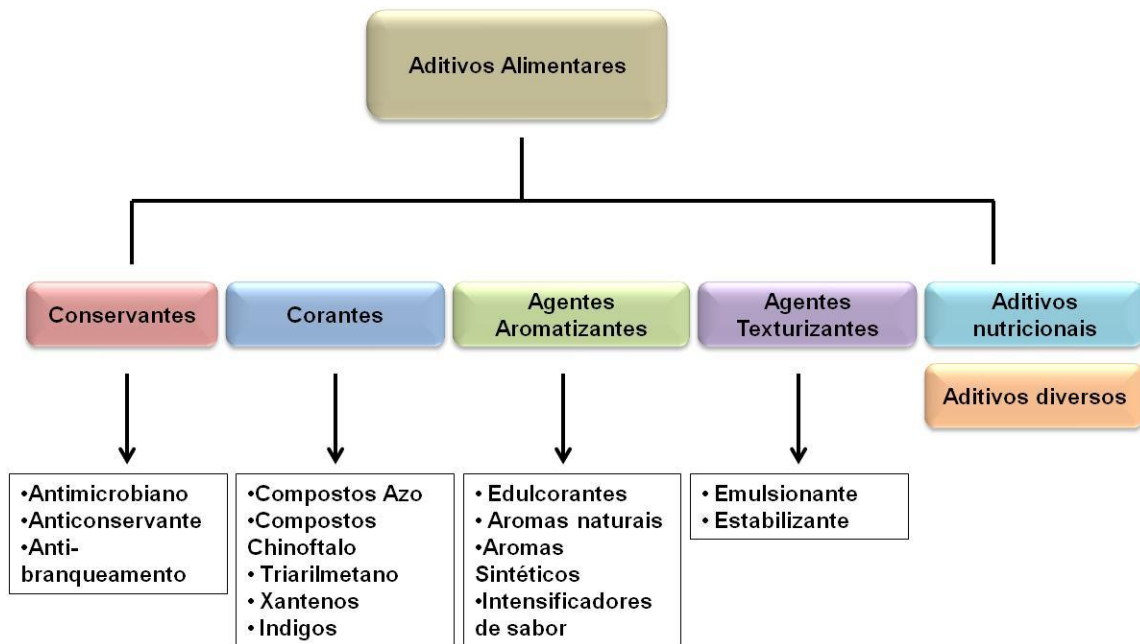
Drogas e Alimentos; ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
**(Figura 2).**



**Figura 2** – Resumo dos órgãos reguladores e critérios de avaliação responsáveis pela segurança dos aditivos alimentares.

Quanto à classificação internacional dos aditivos alimentares, o Brasil tem algumas discordâncias (REGULAMENTO, 2008; BRANEN et al., 2001; BRASIL, 1997). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o órgão responsável para elaboração e publicação da legislação que dispõe sobre o uso de aditivos com base em legislação internacional, publicou a Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, que classifica os aditivos de acordo com a função nos alimentos, que incluem: Agente de Massa, Antiespumante, Antiumectante, Antioxidante, Corante, Conservador, Edulcorante, Espessantes, Geleificante, Estabilizante, Aromatizante, Umectante, regulador de acidez, Acidulante, Emulsionante/Emulsificante, Melhorador de Farinha, Realçador de Sabor, Fermento Químico, Glaceante, Agente de Firmeza, Sequestrante, Estabilizante de cor e Espumante (BRASIL, 1997). Mais recentemente, a divisão em aditivos alimentares é organizada em classes e subdivisões de acordo a função exercida por cada representante do grupo.

Conforme o GUIA DE PROCEDIMENTOS PARA PEDIDOS DE INCLUSÃO E EXTENSÃO DE USO DE ADITIVOS ALIMENTARES E COADJUVANTES DE TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO NA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA, os aditivos alimentares incluem: acidulante, agente de firmeza, agente de massa, antiespumante, antioxidante, antiumectante, aromatizante, conservador, corante, edulcorante, emulsionante/emulsificante, espessante, espumante, estabilizante, estabilizante de cor, fermento químico, gelificante, glaceante, melhorador de farinha, realçador de sabor, realçador de acidez, sequestrante e umectante (**Figura 3**). As substâncias que não constarem na legislação não podem ser utilizadas em alimentos (BRASIL, 2009).



**Figura 3** - Representação esquemática da classificação dos aditivos alimentares (CAROCHO et al., 2014).

Mesmo sob revisão periódica dos critérios de segurança alimentar, tais como IDA, GRAS e INS, uma série de consequências danosas tem sido relatadas, uma vez que o seu consumo excessivo, principalmente de aditivos sintéticos, tem resultado em problemas de saúde e levado à remoção do mercado (CAROCHO et al., 2014). Portanto, é necessário prudência e atenção aos possíveis riscos toxicológicos que podem ser ocasionados pela ingestão dentro da IDA e/ou excessivamente acima dela (EMERTON; CHOI, 2008; AOKI, SHEN; SAIJO, 2010).

### 3.4 Toxicidade Geral dos Aditivos Alimentares

A Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos causados pela interação entre substâncias químicas isoladas ou misturas de substâncias ou um determinado produto em organismos vivos ou sistemas biológicos. Ela avalia a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos devido à exposição à determinada substância e em quais condições ela pode causar danos. Assim, um novo produto que terá contato direto com o homem tais como medicamento, agrotóxico, aditivos alimentares etc., deverá ser submetido a estudos para prever os riscos toxicológicos (CAZARIN, et al., 2004; AZEVEDO, 2010).



Do ponto de vista dos alimentos, a análise da segurança de qualquer substância alimentar depende do nível de pureza, da via de administração, do modelo experimental, da quantidade utilizada, de efeitos sinérgicos ou antagônicos influenciados metabolismo, tudo isso influenciando o(s) efeito(s) no organismo modelo (HENRY-UNAEZE, 2017). O maior desafio dos pesquisadores e órgãos governamentais têm sido de obter informações para a regulação de alimentos com requerimentos tecnológicos. Obviamente, o uso de aditivos alimentares é aprovado após avaliação toxicológica com a realização de estudos de toxicidade aguda, subaguda e crônica, para compreender as variações de efeitos base na dose, idade, sexo, estado nutricional e fatores genéticos, mas também de acordo com a exposição a longo prazo a baixas doses (MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007). Apesar de estudos de toxicidade laboratorial para avaliação dos riscos sejam importantes, estudos epidemiológicos de aditivos alimentares são realizados para investigação do risco toxicológico para os seres humanos, mesmo que existam limites de avaliação precisa da exposição a essas substâncias (SASAKI et al., 2002). A relação com a insegurança de uso pode está relacionada à falta de informação devido à ausência de pesquisas (LEE et al., 2014), de informações obtidas nas mídias, devido à desconfiança nos fabricantes de alimentos e questionamentos sobre a segurança do uso a longo prazo, efeito(s) combinado(s) com outros aditivos e fármacos (MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007; SHIM; SOON-MI et al., 2011).

As reações adversas que caracterizam toxicidade de aditivos podem surgir a nível sistêmico (por exemplo, alergias e alterações no comportamento), ou a nível tecidual, como também genotoxicidade e/ou carcinogenicidade. Porém, alguns desses efeitos só podem ser observados a longo prazo, o que dificulta sobremaneira o entendimento dos mecanismos farmacotoxicológicos (POLÔNIO; PERES, 2009; SHIM, SOON-MI., 2011; CHOE et al., 2005; KIM; KIM, 2005)

Nesse contexto, destacam-se os aditivos alimentares mais utilizados pela indústria alimentícia e mais descritos na literatura quanto à toxicidade: aromas, corantes, conservantes (antimicrobianos), edulcorante, realçadores de sabor, antioxidantes e óleos essenciais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; SASAKI et al., 2002). Na **Tabela 1**, os aditivos mais citados na literatura foram

listados de acordo a classificação, IDA, usos e efeitos sobre os modelos experimentais testados.

**Tabela 1** - Classes, exemplos, IDA e possíveis efeitos dos aditivos alimentares mais usados.

Classificação dos Aditivos Alimentares					
Classe	Exemplos	IDA	Principais usos	Efeitos	Referências
<b>Conservantes</b>	Benzoatos	5 mg/kg/dia	Bebidas (principalmente refrigerantes), sucos de frutas, geléias, molhos, salsichas, calabresas, bacon,	Distúrbios metabólicos de absorção de glicose (diabetogênico), imunossupressor, clastogênico, mutagênico e genotóxico	(LENNERZ et al., 2015; YADAV et al., 2016; ZENGIN et al., 2011)
	Sorbatos Ex: ácido sórbico	25 mg/kg/dia	salame, presunto e mortadela	Genotóxico e mutagênico, Ativação de genes em processos inflamatórios	(MAMUR, et al., 2010; RAPOSA et al., 2016)
	Nitritos Ex: Sódio ou Potássio	0,07 mg/kg/dia		Citotóxico, mutagênico, teratogênico, embriotóxico, produção de meta-hemoglobina, cancerígeno.	(NTP, 2001; WHO, 2003; ANSARI, ALI, MAHMOOD, 2015)
	Nitratos	0-3,7 mg/kg/dia		Mutagênico, cancerígeno.	(ALEXANDER et al., 2008; EFSA, 2008)
	Sulfito	0,7 mg/kg/dia		Citotóxico, cancerígeno, reações de intolerância, anafilaxia, urticária, angioedema, hipotensão, náusea, irritação gástrica local, diarreia e crise asmática.	(IAMMARINO et al., 2012; SUH et al., 2007; MACHADO; TOLEDO, 2006)

Corantes				
Carmim (natural)	0-5 mg/kg/dia	Carnes, bebidas, em sumos de fruta, laticíneos, gelados, produtos de confeitaria, doces,	Reações alérgicas (urticária, angioedema e anafilaxia) – ingestão.	(TABAR et al., 2003; VOLP, RENHE, STRINGUETA, 2009)
Tartrazina	0-7,5 mg/kg/dia	gomas de mascar, geleias, pudins, refrescos, mostarda, refrigerante e lanches, cereais, balas, recheios, xaropes e preparados líquido, sobremesas.	Irritabilidade, inquietação, distúrbios em crianças; Insônia em crianças; Dermatite atópica – aumento de leucotrieno (reações alérgicas), citotóxico, genotóxico, mutagênico e cancerígeno.	(ROWE; ROWE, 1994; BASTAKI et al., 2017; SILVIA, 2008; WORM et al., 2001; SASAKI et al., 2002; THIAM et al., 2014; PICCIN et al., 2009; MPOUNTOUKAS et al., 2010; SOARES et al., 2016; GOMES et al., 2013)
Amaranto vermelho Bordeaux	ou 0,5 mg/kg/dia			Danos ao DNA nos órgãos gastrointestinal e cólon, citotóxico..
Vermelho allura	7,0 mg/kg/dia			
New coccine	4,0 mg/kg/dia			
Floxina	0,1 mg/kg/dia			
Rosa bengala	0,1 mg/kg/dia			
Vermelho ponceau 4R	0,7 mg/kg/dia			Anemia e doença renal (glomerulonefrite), distúrbios neurocomportamentais, genotóxico e citotóxico.
Azorubina/Carmoi	4,0 mg/kg/dia			Imperatividade em crianças e

	sina E122				isuficiência renal e hepática, 2008; AMIN et al., 2010; McCANN et al., 2007)
	Amarelo-sol	0-2,5 mg/kg/dia			Hiperatividade e citotóxico (McCANN et al., 2007; EFSA, 2009a; GOMES et al., 2013)
	Amarelo quinolina	0-0,5 mg/kg/dia			Distúrbios (EFSA, 2009b; McCANN et al., 2007) neurocomportamentais, danos ao DNA.
	Benzoato de sódio	5 mg/kg/dia			Distúrbios (McCANN et al., 2007; SASAKI et al., 2002) neurocomportamentais
<b>Realçador de sabor</b>	L-Glutamato de sódio	de 30 mg/kg/dia	Biscoitos, doces, salgadinhos, embutidos, molhos prontos, sopas prontas, caldos de carne e temperos artificiais.	Hipersensibilidade, toxicidade renal	(KWORD, 1968; SHARMA, 2015).
<b>Antioxidantes</b>	Butil Hidroxianisol (BHA)		Óleo vegetais (coco, palma), maionese,	Danos no DNA de células glandulares estomacais	(SASAKI et al., 2002)
	Butil-hidroxitolueno (BHT)	0,5 mg/kg/dia	margarinas, cremes vegetais.	Danos no DNA de células glandulares estomacais, bexiga e cérebro	
<b>Edulcorante</b>	Ciclamato de sódio	de 11mg/kg/dia	Adoçante dietético,	Danos no DNA de células glandulares estomacais, cólon, rim e bexiga, citotóxico,	(JECFA, 2000; SASAKI et al., 2002; TORLONI et al, 2007; WEIHRAUCH; DIEHL, 2004; VAN EYK, 2015;

---

		mutagênico e genotóxico em ALVES et al., 2017;) linhagens Caco-2, HT-29 e HEK-293; Citotóxico e mutagênico.
Sacarina	5 mg/kg/dia	Danos no DNA de células de cólon, citotóxico, mutagênico e genotóxico em linhagens Caco-2, HT-29 e HEK-293.
Sacarina Sódica	5 mg/kg/dia	Danos no DNA de células glandulares estomacais e de cólon, risco aumentado de câncer de bexiga (30% dos animais testados); Citotóxico, mutagênico.
Ciclamato de 11 e 5 Sódio + Sacarina Sódica	mg/kg/dia	Efeito sinérgico para toxicidade a nível celular
Sucralose	15 mg/kg/dia	Danos no DNA de células glandulares estomacais, de cólon e pulmão
Sorbitol	“Não especificada”	Genotóxico e efeito laxante (CAROCHO et al., 2014) (altas doses)

---

	Acesulfame (E950)	K	15 mg/kg/dia		Toxicidade baixa, hipersensibilidade (dependente da dose), clastogênico, alergênico, citotóxico, mutagênico e genotóxico em células Caco-2, HT-29 e HEK-293.	(CAROCHO et al., 2014; SHANKAR et al., 2013; MUKHERJEE; CHAKRABARTI, 1997; STOHS; MILLER, 2014; VAN EYK, 2015)
	Aspartame		40 mg/kg/dia		Nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, danos aos nervos, câncer e diabetes tipo II, citotóxico, mutagênico e genotóxico em células Caco-2, HT-29 e HEK-293.	(SOFFRITTI et al., 2010; VAN EYK, 2015)
	Óleo da casca de <i>Cinnamomum glanduliferum</i>		“Não especificada”		-	Citotóxica em células humanas HCT-116 (carcinoma colorretal), HepG-2 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) TAHA, 2017
<b>Aromatizante</b>	Diacetil, 2,3-diona, Biacetil	Butano-	0,17 mg/kg/dia	Produtos lácteos, vinho, café, cerveja,	Bronquiolite obliterante e morte	(COLLEY et al., 1969; KREISS et al., 2007; MORGAN et al., 2012)

			pipocas, biscoitos, lanches, pães, leite, manteiga, café, soja, cereais, alimentos amassados, bebidas, sorvetes e doces.	Mutagênico	(WHITTAKER et al., 2008)
				Sintomas de doença de Alzheimer;	(MORE et al., 2012)
				Aducto em 2- desoxiguanosina	(MORE et al., 2012)
				Aducto em proteínas (hemoglobina e albumina)	(FENNELL et al., 2015; HUBBS et al., 2016)
2,4-Pentanedione	IDA	não alocada		Lesão no epitélio das vias aéreas e morte.	(HUBBS et al., 2012; MORGAN et al., 2012)
2,3-Hexanodiona, 2,4-Hexanodiona, 2,5-Henanodiona	IDA	não alocada		Neurotoxicidade e lesão no epitélio das vias aéreas	(IWASAKI; TSURUTA, 1984; MORGAN et al., 2012)
Biscoito, tutti-frutti	IDA	não alocada		Citotoxicidade e genotoxicidade	(SALES et al., 2017b)
Uva, ameixa e laranja	IDA	não alocada		Toxicidade a nível celular	(SALES et al., 2017a)
Maracujá, morango, baunilha, chocolate, tutti-frutti e biscoito	IDA	não alocada		Toxicidade a nível celular	(SALES et al., 2017c)
Baunilha + tutti-frutti	IDA	não alocada		Citotoxicidade e genotoxicidade	(SALES; SANTOS; PERON, 2017d)
Manteiga, cebola	IDA	não alocada		Genotoxicidade	(CARVALHO et al., 2016)



e queijo cheddar	alocada	citotóxicidade em linhagens humanas normais e tumorais
Maltol	< 1 mg/kg/dia	Toxicidade nos rins e fígado e carcinogenicidade (OMS, 2006; GRALLA et al., 1969; RENNHARD, 1971; WHO, 2006)

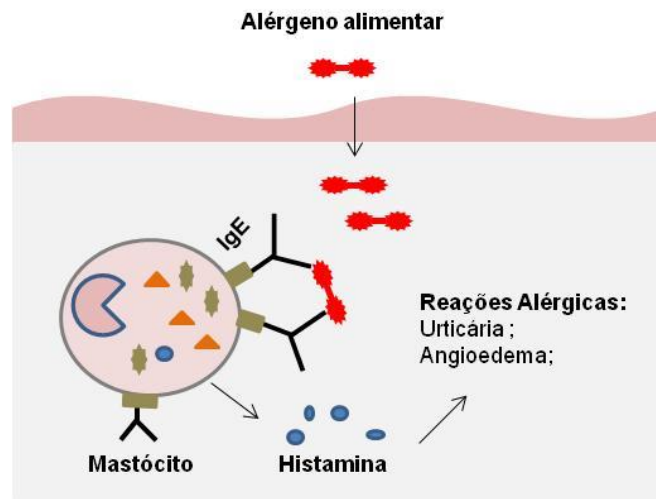
\* **IDA** – Ingestão Diária Aceitável. **Fonte:** Autoria própria.

### 3.4.1 Corantes

A cor é considerada um atributo e uma das qualidades externas mais importantes nos alimentos, especialmente quando se leva em consideração a aceitação pelos consumidores. Assim, a indústria adiciona os corantes naturais ou sintéticos aos alimentos para conferir, intensificar ou restaurar a cor dos alimentos desprovidos de cor (afetadas durante as etapas de processamento, estocagem, embalagem e distribuição) (BRANEN et al., 2002; EMERTON; CHOI, 2008; CONSTANT; STRINGUETA; SANDI, 2002).

Hoje em dia, há um interesse crescente em substituir corantes artificiais, uma vez que foram responsabilizados por quadros de intoxicação. No entanto, corantes artificiais e os naturais continuam sendo intensivamente usados (BRAUCH et al., 2016), mesmo os que tem recebido atenção especial quanto à toxicidade, como o carmim, tartrazina, amaranto, vermelho allura, new coccine, floxina, rosa bengala, e azorubina, amarelo-sol, carmoisina, ponceau 4R e amarelo quinolina (**Tabela 1**).

O carmim é um dos corantes naturais vermelhos mais apreciados, especialmente antes da introdução de corantes artificiais, geralmente bem tolerado (IDA de 0-5 mg/kg/dia) e largamente utilizado nas indústrias de carnes (ex.: Surumi), bebidas (ex.: Campari), em sumos de fruta e em produtos lácteos (ex.: iogurtes, gelados ou produtos de confeitaria). Seu extenso uso tem facilitado o surgimento de reações alérgicas tanto pela ingestão como pelo contato subcutâneo direto. O seu mecanismo imunológico é mediado pela ativação linfocitária, produção de anticorpos (Imunoglobulina E – IgE), ativação de mastócitos e basófilos e liberação de histamina, heparina e leucotrienos, dentre outras moléculas com ação quimiotática e pro-inflamatória e, conseqüentemente, reações sistêmicas, como urticária, angioedema e falta de ar (TABAR et al., 2003; POLÔNIO, PERES, 2009) (**Figura 4**).



**Figura 4** - Mecanismo geral de reações alérgicas causadas por aditivos alimentares, como o carmin.

Dentre os corantes sintéticos azo existentes, destacam-se a tartrazina (ácido 23,1- (4-sulfonatofenil)-4-(4-sulfonatofenilazo)-5-pirazolona-3-carboxilato de trisódio), também conhecido como ácido amarelo 23 ou E102. Ele fornece uma cor amarela em doces coloridos (balas e gomas), bebidas, geleias, pudins, sucos, mostarda, refrigerantes e lanches, sendo autorizado para uso com IDA de 7,5 mg/kg/dia (MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007; THIAM et al., 2014). No entanto, um estudo com administração da IDA de tartrazina em ratos em um período de 46 semanas aumentou o número de células do sistema imunológico (eosinófilos e linfócitos) no antro estomacal, o que sugere possíveis efeitos alergênicos da tartrazina, como encontrado em outros estudos (WORM et al., 2001; BRASIL, 2002; MOUTINHO; BERTGES; ASSIS, 2007).

Danos ao genoma também foram observados em vários órgãos (côlon, glândulas exócrinas do estômago, fígado, rins, bexiga e pulmões) de 3 h e 24 h após a administração de 10 mg/kg de tartrazina. Acredita-se que a tartrazina seja mutagênica e cancerígena uma vez que ela sofre redução da amina aromática e forma ácido sulfanílico em reações metabólicas catabolizadas pela microflora intestinal, embora tal mecanismo ainda seja muito incerto (PICCIN et al., 2009; THIAM et al., 2014). Resultados semelhantes foram vistos com os corantes *new coccine*, *allura red* e amaranço, diferenciando-se a toxicidade em relação aos órgãos afetados e períodos de exposição analisados (SASAKI et al., 2002).

Os corantes sintéticos amaranço, eritrosina e tartrazina mostraram-se potencialmente tóxicos *in vitro* ao DNA de células de sangue periférico humano conferindo potencial genotóxico, citotóxico e citostático (MPOUNTOUKAS et al., 2010). O amarelo quinolona em baixas concentrações (0,5 a 20 µg/mL) foi genotóxico também em células de carcinoma hepatocelular HepG-2 e interfere na estabilidade do DNA causando quebras (clastogenicidade) e perdas (aneugenicidade) cromossômicas, o que pode representar um sério risco para a saúde dos consumidores (CHEQUER et al., 2015).

Entre os corantes da classe dos xantenos (eritritina, flocina e rosa bengala), danos dose dependentes ao DNA também foram encontrados para células glandulares do estômago e de cólon e bexiga urinária após 3 h da administração. De fato, os corantes são considerados genotoxinas para órgãos do trato digestório, embora nesse estudo o efeito de carcinogenicidade não tenha sido observado e o efeito de genotoxicidade não seja o principal fator para o seu surgimento, pois alguns outros fatores estão envolvidos como a produção de metabólitos reativos, distribuição tecidual, meia vida plasmática, metabolismo hepático e polimorfismo genético das enzimas tipo citocromo P450 e efeito(s) sobre a proliferação celular de células normais (SASAKI et al., 2002).

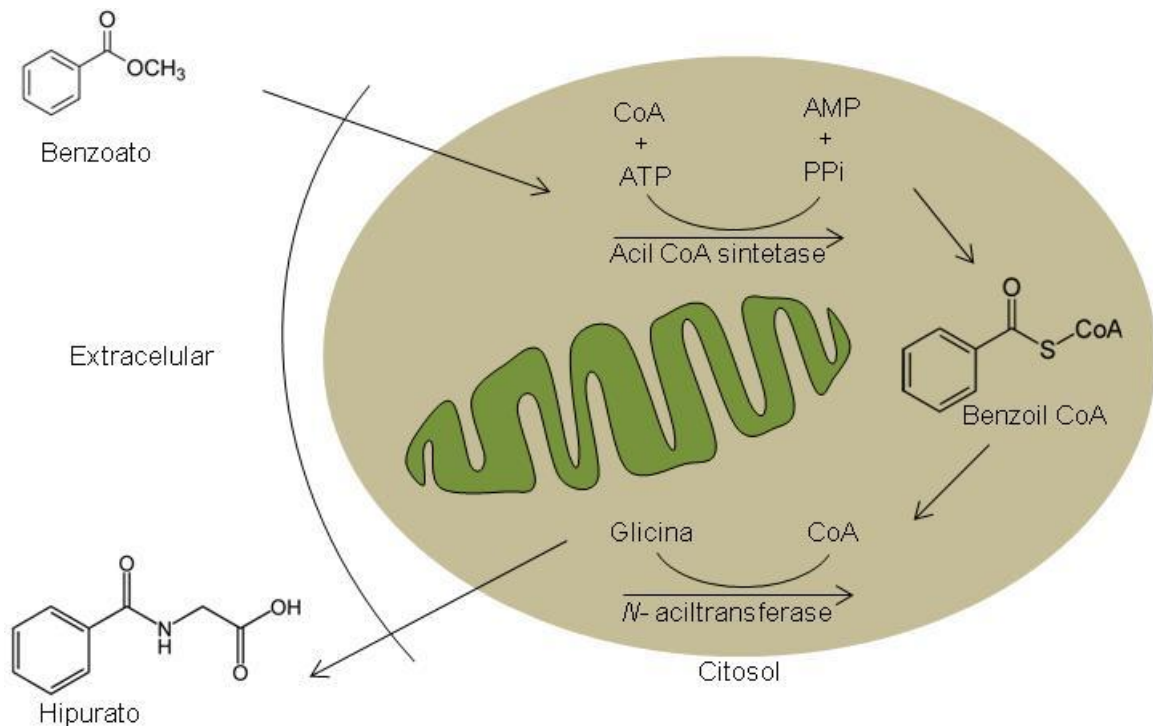
Alimentos coloridos artificiais têm sido responsabilizados há muito tempo sugeridos por afetar o comportamento em crianças. Um estudo realizado com 300 crianças submetidas ao uso de uma mistura de corantes sintéticos (amarelo-sol, carmoisina, tartrazina, vermelho ponceau 4R, benzoato de sódio, amarelo quinolona e vermelho de allura AC) revelou respostas adversas significativas e diagnóstico da Síndrome de Transtorno de Hiperatividade com Déficit de Atenção (TDAH) (McCANN et al., 2007). Além disso, pesquisadores da FDA afirmaram que corantes sintéticos estão relacionados com algum tipo de toxicidade central resultando em alterações comportamentais adversas leves a moderadas, incluindo irritabilidade, agitação, problemas de sono, déficit de atenção e agressividade, que não necessariamente são características da síndrome de TDAH (FDA, 2011). Especificamente, o vermelho ponceau 4R e a carmoisina causam anemia e doença renal (glomerulonefrite) e insuficiência renal e hepática, respectivamente (BATEMAN et al., 2004; EFSA, 2008; SILVIA, 2008; AMIN et al., 2010; EFSA, 2010).

Agências aconselham aos pais eliminarem da dieta alimentos coloridos artificialmente (FOOD STANDARDS AGENCY, 2011). Raposa et al., (2016), inclusive, sugere a redução da ingestão de corantes e conservantes artificiais, pois eles podem contribuir de forma sinérgica para o desenvolvimento de cânceres.

### **3.4.2 Conservantes**

Os conservantes impedem ou lentificam a perecibilidade dos alimentos e inibem o crescimento microbiológico, prolongam a vida útil dos mesmos ao reduzir sua degradação e reações indesejadas. Dentre os produtos químicos utilizados como conservantes podemos citar o ácido benzóico, propionato de cálcio, nitrato de sódio, nitrito e sulfitos (ex.: dióxido de enxofre, bissulfito de sódio e sulfito de potássio) (FLETCHER, 2014) (**Tabela 1**).

O benzoato de sódio e o benzoato de potássio são conservantes com propriedades bacteriostáticas e fungistáticas usados em uma variedade de produtos, incluindo bebidas (principalmente refrigerantes), sucos de frutas, geleias, molhos para saladas e estão listados entre os compostos "geralmente considerados como seguros" (GRAS) pela FDA. Notavelmente, vários estudos sugerem que estes aditivos promovem reações mitocondriais que levam à produção de ácido hipúrico, um metabólito que interfere na absorção da glicose, e pode afetar a secreção da insulina e glucagon, além de causar insuficiência renal. A secreção do ácido hipúrico resulta da ação da enzima Acil-CoA sintetase, uma enzima que converte o benzoato em benzoil-CoA e, posteriormente, da ação da enzima N-aciltransferase sobre o benzoil-CoA, formando ácido hipúrico (NAIR, 2001; LENNERZ et al., 2015; REDDY et al., 2015) (**Figura 5**).



**Figura 5** - Metabolismo do benzoato de sódio na mitocôndria.

A Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7), da Secretaria de Segurança e Medicina do Trabalho do Ministério do Trabalho, considera o ácido hipúrico na urina como marcador de exposição ocupacional ao tolueno, um hidrocarboneto aromático volátil, incolor com amplo uso industrial, naturalmente presente no petróleo e combustíveis derivados (principalmente a gasolina), e também em tintas, colas, polidores, diluentes, desengordurantes e removedores. O próprio tolueno é biotransformado em ácido benzoico e este é conjugado com glicina, formando o ácido hipúrico, que é excretado na urina. Assim, o ácido hipúrico pode ser usado como biomarcador de exposição ambiental, cujo valor de referência é de 1,5 g de ácido hipúrico/g de creatinina e o máximo permitido é 2,5 g de ácido hipúrico/g de creatinina, além de provas de função hepática (BRASIL, 1994; KANG et al., 2005; GONZALEZ et al., 2010).

O ácido benzoico é encontrado de forma natural em alimentos como ameixa, morango, amora, groselha, mas também é adicionado como conservante (geralmente em forma de benzoato de sódio, mas conhecido pelas indústrias alimentícias de sucos, refrigerantes, vinhos, sidras, doces, molhos, presuntos, queijos, pães e adoçantes pela sigla E-210). Inclusive, há trabalhos que indicam sua ocorrência também no chimarrão. Conservantes semelhantes

para aplicação como conservantes são o benzoato de sódio (E-211), benzoato de potássio (E-212) e o benzoato de cálcio (E-213), todos rapidamente absorvidos por via oral no trato gastrointestinal proximal e tem farmacocinética similar apesar das diferenças de solubilidade (FONSECA, 2006; THE UK FOOD GUIDE, 2013; EFSA, 2016).

A propriedade imunotóxica do benzoato de sódio investigada em concentração não citotóxica (1000 µg/mL) foi confirmada por suprimir respostas funcionais de linfócitos T e B, parada do ciclo celular na fase G1, causou modulação dos padrões de expressão de vários receptores de superfície (CD8, CD28, CD95), coreceptores (CD19), moléculas coestimuladoras e citocinas (IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e LPS) que desempenham um papel vital na ativação e regulação da imunidade adaptativa (YADAV et al., 2016). Benzoato de sódio e potássio também mostraram efeito genotóxico, mutagênico e clastogênico em linfócitos humanos *in vitro* (ZENGIN et al., 2011; ZENGIN et al., 2017).

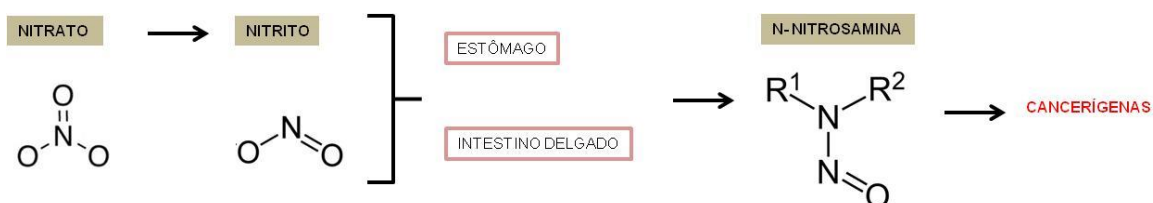
O uso subcrônico oral por gavagem de benzoato de sódio por quatro semanas induziu ansiedade e comprometimento motor em ratos (NOORAFSHAN; ERFANIZADEH; KARBALAY-DOUST, 2014). Em ratas grávidas, ele apresentou um nível de efeito adverso não observado (NOAEL) de 160 mg de ácido benzóico/kg de peso corporal por dia em estudos de toxicidade. Enquanto isso, o benzoato de sódio incorporado na dieta revelou o NOAEL de 500 mg/kg de peso corporal por dia, um valor comparável ao NOAEL após quatro gerações seguidas com de exposição alimentar de ratos ao ácido benzoico (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016). Em humanos, o benzoato de sódio tem sido associado à TDAH e hiperatividade em crianças (KILIC et al., 2006; ARNOLD et al., 2012; BEEZHOLD et al., 2014).

O benzoato de potássio também se mostrou genotóxico em estudos *ex vivo* com linfócitos de sangue periférico humano, quando observaram aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e quebras de fitas de DNA, e mutagênico, quando avaliado no teste de micronúcleo (MPOUNTOUKAS et al., 2008; MAMUR et al., 2010). Estudos realizados na Índia revelaram consumo diário muito mais alto que a IDA (5 mg/kg/dia) recomendada para o ácido benzoico devido, principalmente, à coloração artificial de molhos *chili* e de tomate, embora a adição de corantes sintéticos

para molhos de tomates seja proibida pelas normas indianas (DIXIT et al., 2008).

Sais de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) e nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) são aditivos comumente utilizados em alimentos e podem ser utilizados na alimentação animal como nitrogênio não protéico. O nitrito está naturalmente presente nos seres humanos por serem produzidos durante o metabolismo de compostos amino, reações inflamatórias e durante o metabolismo energético e é amplamente utilizado como fixador de cor em peixes e carnes. Quando absorvido através de água ou alimentos contaminados, afeta principalmente o intestino delgado (biodisponibilidade > 92%), pois o ambiente ácido (<2) favorece grandemente a conversão de nitrito em um agente nitrosante, o que pode resultar na formação de nitrosaminas (**Figura 6**) (BRAMBILLA; MARTELLI, 2007; DUARTE, 2010; ANSARI et al., 2017). Tais compostos N-nitrosos são conhecidos como potentes cancerígenos em várias espécies, inclusive primatas, e as exposições humanas ocorrem pela inalação, ingestão de nitrosaminas pré-formadas ou pela nitrosação endógena, o que pode explicar as atividades mutagênicas e teratogênicas desses compostos. Inclusive estudos *in vivo* mostraram que compostos nitrosos causam cânceres de esôfago, nasofaringe e estômago (MIRVISH, 2013; ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015).

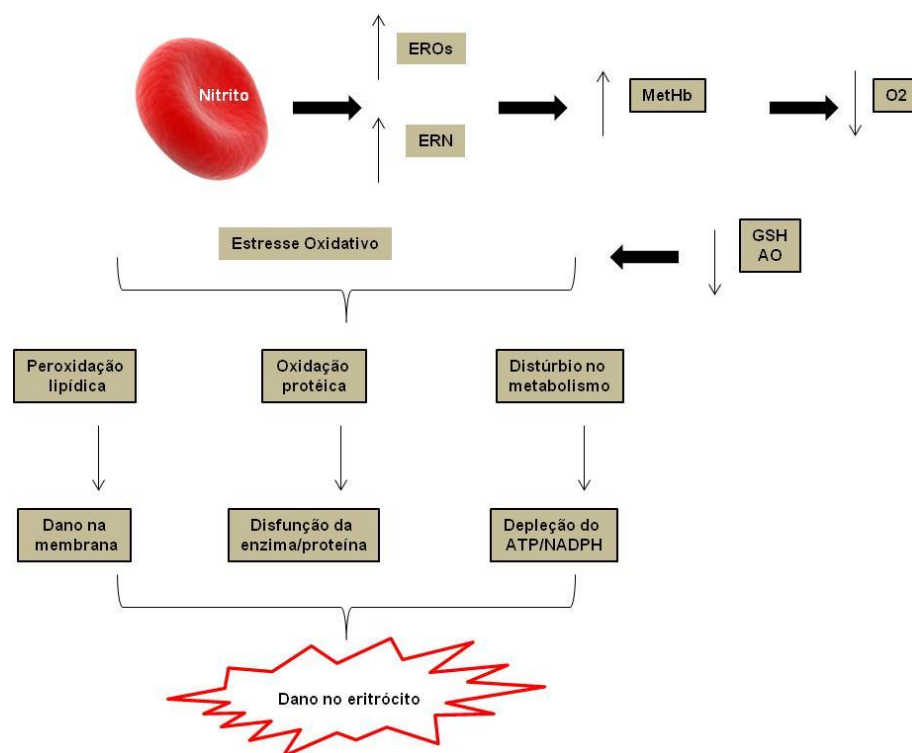
O nitrito é bem mais tóxico que o nitrato. Produz, principalmente, vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa e induz a formação de metahemoglobina. A dose letal para adultos está em torno de 1 grama. Em doses mais baixas, os sintomas são enrubescimento da face e extremidades, desconforto gastrointestinal e dor de cabeça. Em doses tóxicas um pouco mais elevadas observam-se cianose, náusea, vômitos, dores abdominais e colapso (OLIVEIRA; ARAÚJO; BOROG, 2005).



**Figura 6** - Conversão de compostos de nitratos e nitritos em N-nitrosaminas.



Independente da espécie o mecanismo de ação toxicológica de nitratos e nitritos é semelhante. Assim, além do seu mecanismo de reação direta no trato gastrointestinal, a sua rápida absorção pelo intestino delgado favorece a interação com eritrócitos. O nitrito oxida o  $Fe^{2+}$  da hemoglobina a  $Fe^{3+}$ , transformando-o em metahemoglobina (MetHb). De fato, a hemoglobina é um importante alvo de radicais livres do oxigênio e do nitrogênio. A oxidação do ferro ferroso para a forma férrica a torna a MetHb inativa como transportadora de oxigênio e resulta no bloqueio da ação de antioxidantes intracelulares, como a glutaciona, causando intenso estresse oxidativo no eritrócito e peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e diminuição dos níveis de ATP. Tudo isso causa danos celulares e reduz a vida útil da hemácia (levando à senescência), uma vez que os eritrócitos danificados são removidos da circulação pelo baço (CHUI et al., 2005; GONZALEZ; SILVA, 2006; ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015) (Figura 7).



**Figura 7** - Mecanismo mais comum de formação de metahemoglobina pela interação com nitratos e nitritos. AO, antioxidante, GSH, glutaciona, MetHb, metahemoglobina, ROS, espécies reativas de oxigênio; RNS, espécies de nitrogênio reativo, NADPH, fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reduzido). Adaptado de Ansari; Ali; Mahmood (2015).

Há relatos de morte dos animais com 80-90% da hemoglobina oxidada. Os níveis normais de metahemoglobina variam de 0,6 até 1,4%, sendo menor em suínos e maior em cavalos. Mas os animais ruminantes, por consumirem plantas com altos teores de nitratos podem apresentar mais comumente quadros de intoxicação, pois no rumem às bactérias conseguem reduzir o nitrato a nitrito. Tais animais intoxicados apresentam uma série de sintomas, entre eles: anorexia, dispnéia, tremores, salivação, ranger dos dentes, contrações abdominais, andar cambaleante, as mucosas apresentam-se cianóticas, prostração, escurecimento do sangue devido a baixa oxidação e morte. Por serem altamente tóxicos para monogástricos e pouco aproveitados, nitratos e nitritos são excretados na urina, gerando gasto energético para o animal e diminuindo a produtividade (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002; MEDEIROS et al., 2003; GONZALEZ; SILVA, 2006)

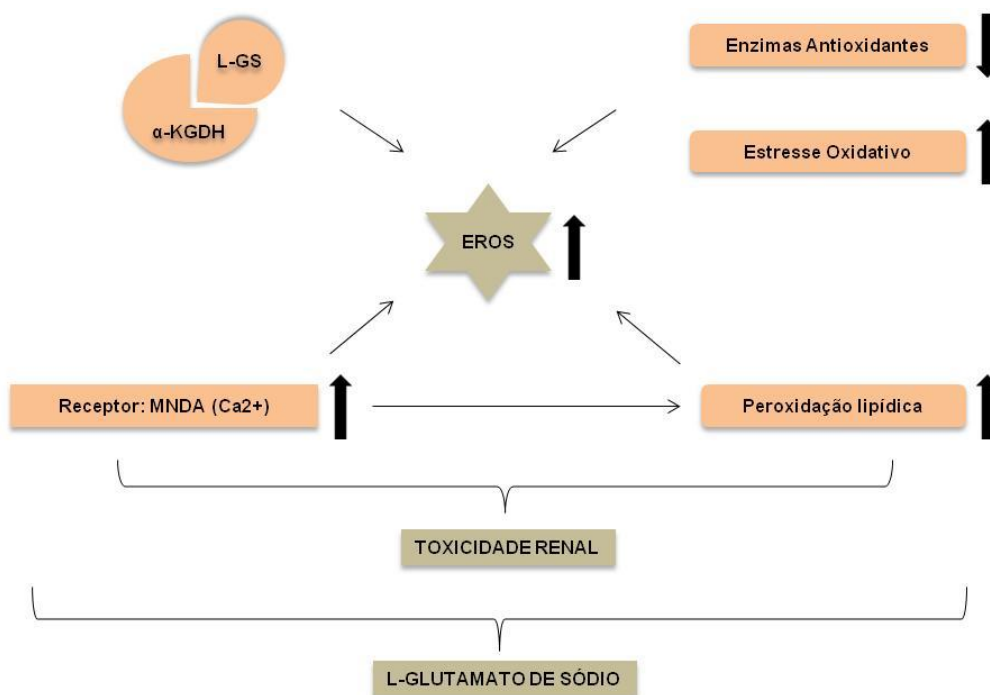
### **3.4.3 Realçador de sabor**

São flavorizantes com a finalidade de reforçar o sabor dos alimentos e dos ingredientes presentes no mesmo. Um dos mais conhecidos é o flavorizante L-Glutamato de Sódio, um sal de sódio proveniente de ácido glutâmico, um aminoácido essencial presente em todos os alimentos protéicos. Esse flavorizante é usado mundialmente como um potencializador de sabor alimentar do tipo *umami* e por qualidades de aprimoramento do sabor (HENRY-UNAEZE, 2017). Alguns órgãos regulamentadores (JECFA, CSF, FASEB e FDA) não consideraram necessário estabelecer a “ingestão diária aceitável” para ácidos glutâmicos e seus sais. No entanto, mais, recentemente a EFSA concluiu a reavaliação da segurança e estabeleceu uma IDA de 30 mg/kg de peso corporal.

Reações de hipersensibilidade em um período de 2 h tem sido relatadas (LEE et al., 2014) e há muita controvérsia sobre relatos negativos dos consumidores sobre alimentos que tem GMS na composição (TARASOLF; KELLY, 1993), mas os efeitos positivos também costumam ser citados (LEE et al., 2014).

A exposição crônica ao aditivo L-Glutamato de Sódio pode levar a sérias alterações renais. Acredita-se que essas alterações estejam relacionadas ao

aumento das atividades da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (*alpha-ketoglutarate dehydrogenase* -  $\alpha$ -KGDH), uma proteína mitocondrial componente do ciclo de Krebs e do sistema antioxidante mitocondrial, agindo como sensor-chave do estado redox, alterando sua função e expressão durante momentos de estresse fisiológico para prevenir danos oxidativos. A  $\alpha$ -KGDH é exclusivamente sensível ao estresse oxidativo, capaz de sofrer inibição reversível mediada por radicais livres ou inativação oxidativa, o que causa consequente aumento de EROS, diminuição de enzimas antioxidantes, aumento do estresse oxidativo, da peroxidação lipídica e ativação do receptor/canal de cálcio do tipo NMNDA (N-metil-D-aspartato), causando aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a níveis citotóxicos. Consideram que essas teorias apoiam fortemente que o estresse oxidativo seja o principal relacionado com a toxicidade renal induzida por L-GS (**Figura 8**) (MCLAIN; SZWEDA; SZWEDA, 2011; SHARMA, 2015).



**Figura 8** - Mecanismo geral da toxicidade do flavorizante L-Glutamato de Sódio.

### 3.4.4 Antioxidantes

Os antioxidantes apresentam propriedades protetoras contra o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como ativado por compostos superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e

radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e os sistemas intracelulares de defesa antioxidante. Os radicais superóxido e hidroxila têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados radicais livres. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre. No entanto, ele representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies reativas de interesse são os oxigênios singletos, que são formas de oxigênio spin-alteradas. Em função da sua aumentada reatividade, em geral, alteram o tamanho e a forma dos compostos e biomoléculas com os quais eles interagem. Os antioxidantes podem proteger biomoléculas, como lipídios e óleos dos alimentos, contra a degradação oxidativa. Quando adicionados aos alimentos, controlam o desenvolvimento da rancidez, retardam a formação de produtos tóxicos de oxidação, mantêm a qualidade nutricional e prolongam a vida útil dos produtos (ALAM et al., 2013; YASHIN et al., 2017).

Sejam antioxidantes naturais ou sintéticos, a relação alimentação e saúde *versus* antioxidantes vem se destacando na saúde humana e por questões de segurança alimentar, os sintéticos tem uso limitado como conservantes. Já os naturais obtidos a partir de materiais comestíveis, como especiarias e ervas, têm sido mais procurados e utilizados (BRASIL, 1997; EL-SHOUBAGY; EL-ZAHAR, 2014; YASHIN et al., 2017).

Os antioxidantes naturais que incluem flavonoides, taninos, cumarinas, curcuminoides, xantonas, fenois e terpenoides são muito utilizados por promover benefícios à saúde, tais como a inibição da oxidação de proteínas de baixa densidade, diminuição dos riscos de doenças cardíacas e capacidade antitumoral (JO et al., 2006; LAFKA et al., 2007). Os sintéticos, embora muito utilizados por apresentar potencial antioxidante superior e custo de fabricação inferior, têm tido seu uso desencorajado por causar efeitos adversos à saúde. Dentre os antioxidantes sintéticos aplicados em alimentos os mais usados são: Butil-hidroxianisol, o Butil-hidroxitolueno, o Terc-butilhidroquinona (TBHQ) e o Propilgalato (MARTINEZ-TOME et al., 2001; RAMALHO; JORGE, 2006). Sua aplicação tem sido constantemente reavaliada em razão da geração de possíveis componentes tóxicos ou carcinogênicos formados durante degradação metabólica (JO et al., 2006; PITCHAON et al., 2007).

Butil-hidroxianisol e Butil-hidroxitolueno causam danos genotóxicos às células glandulares de estômago, bexiga e cérebro (SASAKI et al., 2002). O

Terc-butilhidroquinona possui citotoxicidade sobre os timócitos – células T que surgem no timo – provavelmente por indução de despolarização sustentada e elevação do nível intracelular de  $Ca^{2+}$ , o que perturba a sinalização celular. Como o timo é mais ativo durante os períodos neonatal e pré-adolescente, a exposição ao Terc-butilhidroquinona pode resultar em um efeito imunotóxico mais evidente em neonatos e adolescentes (TAKEDA, 2017).

### **3.4.5 Edulcorantes**

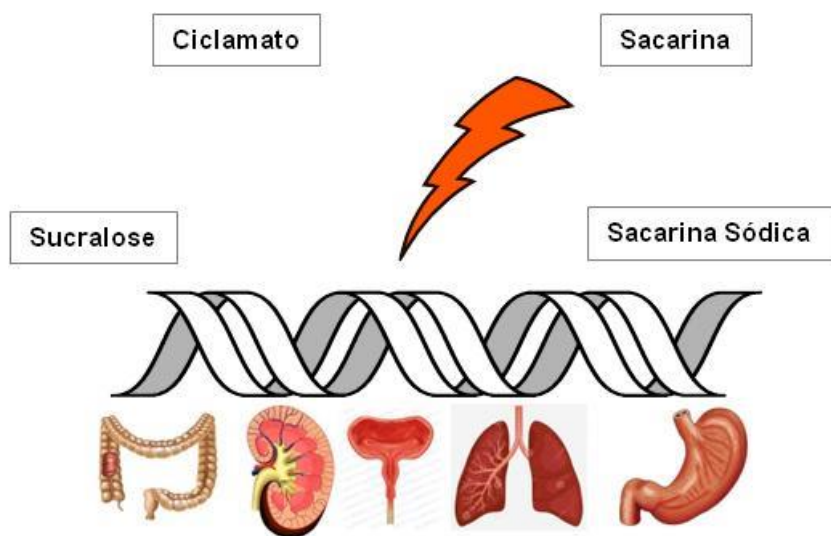
Os edulcorantes são substitutos de açúcar adicionados aos alimentos em qualquer fase do processamento com intenção de dar sabor doce mas reduzindo valores calóricos (JAIN; GROVER, 2015).

Os edulcorantes surgiram na década de 1800. Com a crescente prevalência de doenças diretamente relacionadas ao consumo excessivo de açúcar (diabetes mellitus), cardiovasculares, dislipidemias e cânceres, geralmente associadas ao consumo aumentado e diário de calorias, hoje em dia, os edulcorantes são generalizadamente usados em alimentos e altamente pesquisados por seu impacto na saúde, na economia e na sociedade. (MOORADIAN et al., 2017).

O poder edulcorante é medido em relação à sacarose, que é o açúcar de referência 1 e com maior poder edulcorante. Uma solução de 30 g/L a 20 °C tem um poder edulcorante de 1, com o limiar da concentração mínima para detectar o açúcar de 1-4 mM). Mais para algumas bebidas, o sabor doce pode ser obtido sem açúcar adicionando edulcorantes, proteção contra danos oxidativos como antioxidantes, conferindo sabor e aromas como os aromatizantes sem apresentar qualquer nutrição aos alimentos, tornando-se um método mais barato.

Embora “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS), edulcorantes tais como aspartame, ciclamato, acesulfame K, tagatose, sucralose e, mais recentemente, os glucósides de estiviol, todos autorizados em mais de 50 países, inclusive no Brasil, a IDA estabelecida mostra sinais de toxicidade (ASAE, 2006; CODEX, 2007; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2017). Assim, estudos com diversos edulcorantes revelaram danos ao DNA de vários órgãos de ratos quando submetidos ao tratamento de 3 a 24 h e analisados pelo ensaio do cometa em doses menores que 1000 mg/kg para sacarina e

sacarina sódica e 2000 mg/kg para ciclamato de sódio e sucralose (SAZAKI et al., 2002) (**Figura 9**).



**Figura 9** - Danos sistêmicos a camundongos causados por edulcorantes.

Efeitos citotóxicos e mutagênicos do aspartame, ciclamato de sódio, acesulfame K e sacarina foram encontrados para as linhagens Caco-2 (carcinoma humano de cólon), HT-29 (carcinoma humano de cólon) e HEK-293 (células embrionárias renais humanas) após 72 h de exposição (VAN EYK, 2015). De acordo com estudos laboratoriais experimentais, sacarina sódica aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer de bexiga em cerca de 30% (WEIHRAUCH; DIEHL, 2004). Ainda, sacarina de sódio e sódio apresentaram efeitos citotóxicos e mutagênicos em células vegetais usando o bioensaio *Allium cepa* e em células do sangue periférico de camundongos mesmo usando as concentrações permitidas pela legislação brasileira, principalmente se houver o uso simultâneo de ambos os adoçantes (OLIVEIRA et al., 2017). Embora não existam evidências de riscos para seres humanos, os estudos em animais incentivaram a proibição desses edulcorantes em alguns países, como Canadá, EUA, Inglaterra, França e Japão (UÇAR; YILMAZ, 2015; MISHRA et al., 2015).

### 3.4.6 Aromatizantes

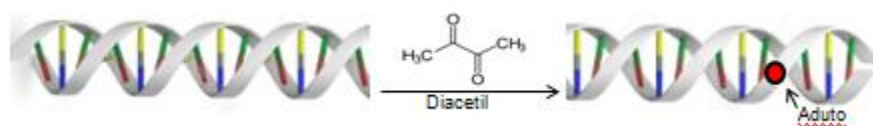
Os aromatizantes são aditivos amplamente consumidos pela população e usados em alimentos processados como refeições congeladas, biscoitos,

pipocas, lanches e pães para aumentar a palatabilidade, conferindo o aroma ou sabor aos alimentos sem conferir nutrição (BRANEN et al., 2002; EMERTON; CHOI, 2008; BRASS; PALMER, 2017). É importante ressaltar que, para cada classe de aromatizantes e flavorizantes, cerca de trinta compostos químicos podem estar presentes (BRASIL, 2007), o que, obviamente, dificulta a determinação e da correlação de sinais e sintomas pré-clínicos e clínicos de toxicidade aguda, subcrônica ou crônica.

#### 3.4.6.1 Diacetil

O Diacetil ( $C_4H_6O_2$ ), também conhecido como 2,3-butanodiona, é um microingrediente aromatizante derivado da fermentação e adicionado em alguns alimentos por conferir o sabor amanteigado, cuja IDA definida é de 0,17 mg/kg/dia. Embora classificado pela FDA como “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS), muitos são os relatos desse aromatizante sobre toxicidade (STAREK-SWIECHOWIEZ; STAREK, 2014; BRASS; PALMER, 2017; BRASIL, 2012).

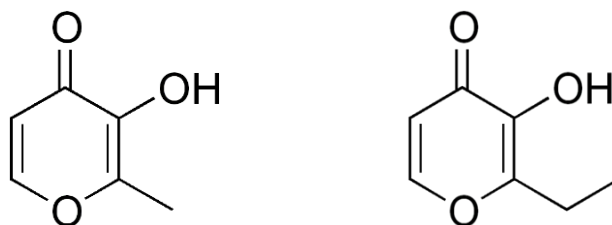
Dados indicam que casos de bronquiolite obliterante estejam associados à inalação do diacetil por trabalhadores de fábrica de pipoca de micro-ondas e essa relação tem sido observada em estudos pré-clínicos com ratos, os quais apresentaram lesão no epitélio das vias aéreas. Adutos nas proteínas hemoglobina e albumina de camundongos foram formados pela interação com diacetil radiomarcada (**Figura 10**). Similarmente, lesões alveolares foram detectadas em ratos e camundongos expostos a 2,3-pentanodiona. Já a hexanodiona causou alterações histológicas apenas nos pulmões de camundongos, sugerindo toxicidade espécie-específica (KREISS et al., 2007; HUBBS et al., 2012; MILLER; GERRAD, 2005; ZACCONE et al., 2015; FEDAN et al., 2006; MORE et al., 2012a, b; KELLY et al., 2014; FENNELL et al., 2015; HUBBS et al., 2016). Sinais de neurotoxicidade também foram vistos com os compostos 2,3-hexanodiona, 2,4-hexanodiona e 2,5-hexanodiona em ratos (IWASAKI; TSURUTA, 1984).



**Figura 10** - Interação do DA ao DNA causando adutos.

### 3.4.6.2 Maltol

Maltol ( $C_6H_6O_3$ ) ou 3-hydroxi-2-metilpiran-4-ona é um pó cristalino branco que tem cheiro de caramelo e é um derivado de  $\gamma$ -pirona (**Figura 11**). Ele possui propriedades quelantes metálicas devido à presença de um grupo ceto-enol  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado (KAHN; BEN-SHALOM, 1998). A IDA de maltol está abaixo de 1 mg/kg/dia (OMS, 2006). Maltol não está apenas disponível em alimentos como pão, leite, manteiga, porco não curado, cerveja, cacau, café e feijão, mas também pode ser formado sob condições de cozimento e assados simples (WHO, 2006).



**Figura 11** – Estrutura molecular do maltol e do etil maltol.

Do ponto de vista farmacocinético, o maltol é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal, metabolizado no fígado [por glucoronidação (UDP-glicunoril transferase A6 - UGT1A6) e sulfatação] e excretado pelos rins (RENNHARD, 1971). No entanto, estudos subcrônicos de 90 dias demonstraram efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos em ratos e cães, especialmente após administração aguda. Observou-se hemossiderina nas células de Kupffer de cães que receberam 250 mg/kg/dia de maltol. Em doses de 500 mg/kg/dia, verificaram-se casos de degeneração testicular, sinais tóxicos indicativos de quelação de ferro de hemólise aguda. Estes efeitos não foram observados num segundo estudo efetuado em cães que receberam até 300 mg/kg/dia (GRALLA et al., 1969).

Em ratos, a dose de 1000 mg/kg/dia de maltol inibiu o crescimento normal e produziu danos renais. O etil maltol na mesma dose não causou efeitos grosseiros, mas o mesmo tipo de lesão renal com menor incidência foi observado microscopicamente. O etil maltol na mesma dose produziu sinais transitórios de uma anemia hemolítica leve. Este produto químico foi bem



tolerado por dois anos por ratos e cães. Não foram observados efeitos adversos tóxicos no período embrionário ou fetal em doses de até 200 mg/kg/dia. Assim, o etil maltol parece ter uma ampla margem de segurança e, por administração repetida, é menos tóxico do que o homólogo maltol (GRALLA et al., 1969).

Conforme determinado por ensaios *in vitro* de conversão de sal de tetrazólio a formazan, o maltol mostrou toxicidade concentração dependente sobre linhagens de neuroblastoma (camundongos: Neuro-2a; humana: IMR 32) e reduziu a viabilidade de neurônios de hipocampo fetal murino em concentrações micromolares. Eletroforeses revelaram padrões de fragmentação de DNA sugestivos de apoptose (HIRONISHI et al., 1996).

A adição de maltol às células de timo de bezerro estimulou a formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), um indicador para a presença de radicais hidroxila, e adição de catalase, uma enzima normalmente presente endogenamente e que converte peróxido de hidrogênio, um precursor de radical hidroxila, em água e oxigênio, inibiu completamente a formação de 8-OHdG. Antes disso, outra enzima antioxidante endógena chamada superóxido dismutase catalisa a conversão de radicais livres do tipo superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é depois convertido em radicais  $\text{OH}^\cdot$  por  $\text{Fe}^{2+}$  na reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio também oxida a glutathiona reduzida (GSH) levando a uma menor relação GSH/GSSG (oxidada) e um aumento no estresse oxidativo celular. Portanto, a evidência de ação genotóxica, provavelmente, seja resultado da redução de íons metálicos intracelulares por altas concentrações intracelulares de alfa-cetoenóis, sejam eles alicíclicos (ex.: hinoquitiol) ou heterocíclicos (ex.: funareol e maltol), levando, eventualmente, à produção de radicais  $\text{OH}^\cdot$ , danos oxidativos não reparados ao DNA e, eventualmente, à apoptose devido à atividade pro-oxidante (MURAKAMI, 2005, 2007; ALAM et al., 2013; SMITH, 2009).

#### **4 CONCLUSÕES**

Muitas reações adversas têm sido associadas à ingestão de aditivos alimentares. Embora as instituições regulamentadores nacionais e internacionais fiscalizem o uso e a toxicidade de tais aditivos, a grande

diversidade de tipos e classes químicas de aditivos, a complexidade de misturas químicas, as diferenças de aplicação industrial, de combinação de produtos, de consumo diário, de metabolismo individual (em relação ao polimorfismo genético, idade e sexo), o uso concomitante ou não de diferentes tipos de aditivos e na presença de enfermidades, além do surgimento de reações idiossincrásicas exigem, constantemente, o aperfeiçoamento das ações sanitárias de controle alimentar visando à proteção à saúde da população e a atualização de regulamentos técnicos sobre uso e limites diários dos aditivos alimentares.

A maioria dos órgãos reguladores se opõem a algumas pesquisas que demonstram toxicidade de aditivos alimentares pelo fato de tais estudos serem realizados usando doses acima dos níveis máximos recomendados com base na IDA, o que impede ou desmotiva a suspensão ou retirada de tais aditivos do mercado. Essa atitude dos órgãos regulamentadores acontece mesmo num ambiente de incerteza quanto à quantidade de aditivos usada nos processos de fabricação de produtos alimentícios em grande escala (ex.: indústrias) ou pequena escala (ex.: padarias, bolarias, confeitarias e residências), ou se a quantidade usada de cada aditivo está de acordo com as necessidades organolépticas dos consumidores. Na verdade, os aditivos mais comuns em lojas especializadas em artigos de festas e similares, como corantes, aromatizantes, estabilizantes e flavorizantes, são vendidos de forma livre e indiscriminada, sem controle de quantidade por pessoa física ou jurídica, o que sugere, erroneamente, que tais substâncias sejam inócuas ou inertes ao organismo humano ou ao meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

AOKI, K.; SHEN, J.; SAIJO, T. Consumer reaction to information on food additives: Evidence from an eating experiment and a field survey. **Journal of Economic Behavior & Organization**, v. 73, n. 3, p. 433–438, 2010.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

ALEXANDER, J.; BENFORD, D.; COCKBURN, A.; CRAVEDI, J. -P.; DOGLIOTTI, E.; DI DOMENICO, A.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L.; FINK-GREMMELS, J.; FÜRST, P.; GALLI, C.; GRANDJEAN, P.; GZYL, J.;

HEINEMEYER, G.; JOHANSSON, N.; MUTTI, A.; SCHLATTER, J.; VAN LEEUWEN, R.; PETEGHEM, C.V.; VERGER, P. Nitrate in vegetables - scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. **European Food Safety Authority Journal**, 689, p. 1-79, 2008.

ALL FLAVORS. **Os aromas e os alimentos**. 2016. Disponível em: <[http://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201601/2016010985235001454074039.pdf](http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201601/2016010985235001454074039.pdf)>. Acesso em 02 jun 2017.

ALVES, V. O.; MEDEIROS, S. R. A.; SOARES, B. M.; SILVA, F. C. C.; AGUIAR, R. P. S.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C.; PERON, A. P.; SOUSA, J. M. C. Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of two artificial sweeteners by using eukaryotic test systems. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 547-551, 2017.

AMCHOVA, P.; KOTLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 914-922, 2015.

AMIN, K. A.; ABDEL HAMEID, I. I. H.; ABD ELSTTAR, A. H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2994–9, 2010.

ANSARI, F. A.; ALI, S. N.; MAHMOOD, R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v.29, n.7, p.1878-86, 2015.

ANSARI, F. A.; ALI, S. N.; ARIF, H.; KHAN, A. A.; MAHMOOD, R. Acute oral dose of sodium nitrite induces redox imbalance, DNA damage, metabolic and histological changes in rat intestine. **PLoS One**, v. 6, n. 4, 2017.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.

ARNOLD, L. E.; LOFTHOUSE, N.; HURT, E. Artificial food colors and attention-deficit/hyperactivity symptoms: conclusions to dye for. **Neurotherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 599–609, 2012.

ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). Lisboa: ASAE, 2006. Disponível em: <<http://www.asae.pt/>>. Acesso em: 13 out. 2017.

AZEVEDO, F. A. A toxicologia e o futuro. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.3, n.3, 2010.

BATEMAN, B.; WARNER, J. O.; HUTCHINSON, E.; DEAN, T.; ROWLANDSON, P.; GANT, C.; GRUNDY, J.; FITZGERALD, C.; STEVENSON, J. The effects of a double blind, placebo-controlled, artificial food colourings and

benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. **Archives of Disease in Childhood**, v. 89, n. 6, p. 506–551, 2004.

BEEZHOLD, B. L.; JOHNSTON, C. S.; NOCHTA, K. A. Sodium benzoate–rich beverage consumption is associated with increased reporting of ADHD symptoms in college students a pilot investigation. **Journal of Attention Disorders**, v. 18, n. 3, p. 236–241, 2014.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. **Mutation Research**, v. 635, n. 1, p. 17-52, 2007.

BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M.; SALMINEN, S.; THORNGATE, J. H. Food additives. Edição 2. New York: Marcel Dekker Inc, 2002.

BRASIL. **Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7). Portaria nº 24 de 29 de dezembro de 1994.** Estabelece a obrigatoriedade de elaboração e implementação, por parte de todos os empregadores e instituições que admitam trabalhadores como empregados, do Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional - PCMSO, com o objetivo de promoção e preservação da saúde do conjunto dos seus trabalhadores. Disponível em: <<http://sislex.previdencia.gov.br/paginas/05/mtb/7.htm>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego.** Portaria nº 540 - SVS/MS, de 27 de outubro de 1997. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540\\_97.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm)>. Acesso em: 16 ago. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. 2002. Resolução n. 572, 5 de abril de 2002. Diário Oficial da União, n. 66. Brasília, DF, 8 de abril de 2002. Seção 1. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE\\_572\\_2002\\_COMP.pdf/586939e7-1a80-4acc-8e47-7b7203ebd7e8](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_572_2002_COMP.pdf/586939e7-1a80-4acc-8e47-7b7203ebd7e8)>. Acesso em: 05 ago. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada- RDC N. 05, de 15 de Janeiro de 2007.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf)>. Acesso em: 08 fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de procedimentos para pedidos de inclusão e extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira.** 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Guia+de+Procedimentos+para+Pedidos+de+Inclus%C3%A3o+e+Extens%C3%A3o+de+Uso+de+Aditivos+Alimentares+e+Coadjuvantes+de+Tecnologia+de+Fabrica%C3%A7%C3%A3o>>

o+na+Legisla%C3%A7%C3%A3o+Brasileira.pdf/ad2f1a36-276c-4115-ba6b-62ccf3305400>. Acesso em: 17 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico Nº 52/2012, de 28 de novembro de 2012. GPESP/ GGALI/ ANVISA. Esclarecimentos sobre a segurança de uso do aromatizante diacetil.** 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+52%2C+de+28+de+novembro+de+2012/8e1e812b-9ed6-4fc0-bd11-186c3c9f7bdf>>. Acesso em: 05 set. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes.** 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395734/Guia+para+Comprova%C3%A7%C3%A3o+da+Seguran%C3%A7a+de+Alimentos+e+Ingredientes/f3429948-03db-4c02-ae9c-ee60a593ad9c>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Gerencia Geral de Alimentos. Codex Alimentarius.** 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/10d276cf-99d0-47c1-80a5-14de564aa6d3>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

BRASS, D. M.; PALMER, S. M. Models of toxicity of diacetyl and alternative diones. **Toxicology**, v. 388, p. 15–20, 2017.

BRAUCH, J. E.; ZAPATA-PORRAS, S. P.; BUCHWEITZ, M.; ASCHOFF, J.K.; CARLE, R. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? **Food Research International**, v. 89, n. 1, p. 391-398, 2016.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.3, 2004.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: *Quo vadis?* **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to Food, pros and cons: a review of synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377-399, 2014.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, C. F. R. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 302-317, 2017.

CHEQUER, F. M.; VENÂNCIO, V. D. E. P.; SOUZA PRADO, M. R.; CAMPOS DA SILVA E CUNHA JUNIOR, L. R.; LIZIER, T. M.; ZANONI, M. V.; RODRÍGUEZ BURBANO, R.; BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 777, p. 54-61, 2015.

CHEESEMAN, M. A. Artificial food color additives and child behavior. **Environ Health Perspect**, v. 20, n. 1, p. 15-16, 2012.

CHOE, J. S.; CHUN, H. K.; HWANG, D. Y.; NAM, H. J. Consumer perceptions of food - related hazards and correlates of degree of concerns about food. **Journal of Korean Society for Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 66-74, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/GL 03-1989. Guidelines for Simple Evaluation of Food Additive Intake, 2007. Disponível em: <<http://down.40777.cn/stardard/10/CAC-GL%2003-1989%20GUIDELINES%20FOR%20SIMPLE%20EVALUATION%20OF%20FOOD%20ADDITIVE%20INTAKE.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGUETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

DALL'AGNOL, R. P. A. Utilização De Corantes Artificiais Em Produtos Alimentícios No Brasil/ The Utilization Of Artificial Colorings In Alimentary Products In Brazil. In: **Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica**, v. 4, p. 26-37, 2013.

DIXIT, S.; MISHRA, K. K.; KHANNA, S. K.; DAS, M. Benzoate and synthetic color risk assessment of fast food sauces served at street food joints of lucknow India. **American Journal of Food Technology**, v. 3, n. 3, p. 183-191, 2008.

DUARTE, M. T. **Avaliação do teor de nitrito de sódio em lingüiças do tipo frescal cozida comercializadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2010. 87f. Tese (Doutorado em 21 Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

EL-SHOUBAGY, G. A.; EL-ZAHAR, K. M. Oxidative stability of ghee as affected by natural antioxidants extracted from food processing wastes. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 2, p. 213-220, 2014.

EFSA (European Food Safety Agency). Assessment of the results of the study by McCann et al. (2007) on the effects of some colours and sodium benzoate on children's behaviour. **European Food Safety Agency Journal**, v. 660, p. 1-53, 2008.

EFSA (European Food Safety Authority). *Scientific Opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E 110) as a food additive*. **European Food Safety Authority Journal**, 2009; v. 7, n. 11, 1330, 2009a.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on the re-evaluation of quinoline yellow (E 104) as food additive. **European Food Safety Authority Journal**, v. 7, p. 1329, 2009b.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the appropriateness of the food azo-colours Tartrazine (E 102), Sunset Yellow FCF (E 110), Carmoisine (E 122), Amaranth (E 123), Ponceau 4R (E 124), Allura Red AC (E 129), Brilliant Black BN (E 151), Brown FK (E 154), Brown HT (E 155) and Litholrubine BK (E 180) for inclusion in the list of food ingredients set up in Annex IIIa of Directive 2000/13/EC. **European Food Safety Authority Journal**, 8, 1–11, 2010.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the re-evaluation of benzoic acid (E 210), sodium benzoate (E 211), potassium benzoate (E 212) and calcium benzoate (E 213) as food additives. **European Food Safety Authority Journal**, v.14, n. 3, p. 4433, 2016.

EFSA (European Food Safety Authority). **Food additives**. 2009a. Disponível em: <[www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives](http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives)>. Acesso em: 04 dez 2017.

EMERTON, V.; CHOI, E. **Essential guide to food additives**. Cambridge, UK: Leatherhead Publishing, 2008.

FDA (Food and Drug Administration). **Overview of Food Ingredients, Additives & Colors**. International Food Information Council (IFIC) and U.S. Food and Drug Administration. 2010 a. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm094211.htm>. Acesso em: 10/08/2017.

FDA (Food and Drug Administration, Food Advisory Committee - FAC). Overview and Evaluation of Proposed Association between Artificial Food Colors and Attention Deficit Hyperactivity Disorders (ADHD) and Problem Behaviors in Children. **Interim Toxicology Review Memorandum**, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/FoodAdvisoryCommittee/UCM248113.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2017.

FDA. U. S. Food and Drug Administration. **FDA Basics. Does FDA approve the color additives used in food? If so, how does FDA determine their safety?** 2016. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm488219.htm>>. Acesso em: 20 nov 2017.

FEDAN, J. S.; DOWDY, J. A.; FEDAN, K. B.; HUBBS, A. F. Popcorn worker's lung: in vitro exposure to diacetyl an ingredient in microwave popcorn butter

flavoring, increases reactivity to methacholine. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 215, n. 1, p. 17-22, 2006.

FENNELL, T. R.; MORGAN, D. L.; WATSON, S. L.; DHUNGANA, S.; WAIDYANATHA, S. Systemic uptake, albumin and hemoglobin binding of [(14)C]2,3-butanedione administered by intratracheal instillation in male Harlan Sprague Dawley rats and oropharyngeal aspiration in male B6C3F1/N mice. **Chemico-biological interactions**, v. 227, p. 112-119, 2015.

FLETCHER, N. Food Additives: Preservatives. **Encyclopedia of Food Safety**, v. 2, p. 471-3, 2014.

FONSECA, E. P.; JOHANN, I.; ALEGRETTI, A. P.; THIESEN, F. V. Interferência do consumo de Chimarrão nos níveis de ácido hipúrico urinário. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 3, p. 163-165, 2006.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Edição 42, p. 21. 2017. Disponível em: <[http://revistafi.com.br/upload\\_arquivos/201711/2017110730727001512043728.pdf](http://revistafi.com.br/upload_arquivos/201711/2017110730727001512043728.pdf)>. Acesso em: 21 Jun. 2017.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Edição 9. **Dossiê Corantes**. 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2017.

FOOD STANDARDS AGENCY. 2011. FSA Advice to Parents on Food Colours and Hyperactivity. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/safereating/chemsafe/additivesbranch/colours/hyper/>. Acesso em: 28 out. 2017.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica clínica veterinária**. Editora UFRGS: Porto Alegre, 2006.

GONZALEZ, K. C.; SAGEBIN, F. R.; OLIVEIRA, L. G.; THIESEN, F. V. Estudo retrospectivo dos níveis de ácido hipúrico urinário em exames de toxicologia ocupacional. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 1637-1641, 2010.

HENRY-UNAEZE, H. N. Update on food safety of monosodium L-glutamate (MSG). **Pathophysiology**, v. 24, n. 4, p. 243-249, 2017.

HIRONISHI, M.; KORDEK, R.; YANAGIHARA, R.; GARRUTO, R. M. Maltol (3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) toxicity in neuroblastoma cell lines and primary murine fetal hippocampal neuronal cultures. **Neurodegeneration**, v. 5, n. 4, p. 325-9, 1996.



HUBBS, A. F.; CUMPSTON, A. M.; GOLDSMITH, W. T.; BATTELLI, L. A.; KASHON, M. L.; JACKSON, M. C.; FRAZER, D. G.; FEDAN, J. S.; GORAVANAHALLY, M. P.; CASTRANOVA, V.; KREISS, K.; WILLARD, P. A.; FRIEND, S.; SCHWEGLER-BERRY, D.; FLUHARTY, K. L.; SRIRAM, K. Respiratory and olfactory cytotoxicity of inhaled 2,3-pentanedione in Sprague-Dawley rats? **American Journal of Pathology**, v. 181, n. 3, p. 829-844, 2012.

HUBBS, A. F.; FLUHARTY, K. L.; EDWARDS, R. J.; BARNABEI, J. L.; GRANTHAM, J. T.; PALMER, S. M.; KELLEY, F.; SARGENT, L. M.; HONAKER, J. C.; JACKSON, M. C.; CUMPSTON, A. M.; GOLDSMITH, W. T.; MCKINNEY, W.; FEDAN, J. S.; BATTELLI, L. A.; MUNRO, T.; BUCKALEW-MOYERS, W.; MCKINSTRY, K.; SCHWEGLER-BERRE, D.; FRIEND, S.; KNEPP, A. K.; SMITH, S. L.; SRIRAM, K. Accumulation of Ubiquitin and Sequestosome-1 Implicate Protein Damage in Diacetyl-Induced Cytotoxicity. **American Journal of Pathology**, v. 186, n. 11, p. 2887-908, 2016.

IAMMARINO, M.; TARANTO, A. D.; MUSCARELLA, M. Investigation on the presence of sulphites in fresh meat preparations: estimation of an allowable maximum limit. **Meat Science**, v. 90, n. 2, p. 304-308, 2012.

JAIN, T.; GROVER, K. Sweeteners in Human Nutrition. **International Journal of Health Sciences and Research**, v. 5, n. 5, p. 439-451, 2015.

JO, S. C.; NAM, K.C.; Min, B.R.; AHN, D.U.; Cho, S.H.; Park, W.P.; Lee, S.C. Antioxidant activity of *Prunus mume* extract in cooked chicken breast meat. **International Journal of Food Science & Technology**, v.41, n. s1, p. 15-9, 2006.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ). **Guidelines for the preparation of toxicological working papers for the JECFA** – Genebra, 2000. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/en/tox\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/en/tox_guidelines.pdf)>. Acesso em: 02 out. 2017.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). **FACT SHEET - WHAT IS JECFA?** 2001. Disponível em: <<ftp://193.43.36.92/es/esn/jecfa/what-e.pdf>>. Acesso em: 15 nov 2017.

KANG, S. K.; ROHLMAN, D. S.; LEE, M. Y.; LEE, H. S.; CHUNG, S. Y.; ANGER, W. K. Neurobehavioral performance in workers exposed to toluene. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 19, n. 3, p. 645-50, 2005.

KAPTAN, B.; KAYISOGLU, S. Consumers' attitude towards food additives. **American Journal of Food Science and Nutrition Research**, v. 2, n. 2, p. 21–25, 2015.

KELLY, F. L.; SUN, J.; FISCHER, B. M.; VOYNOW, J. A.; KUMMARAPURUGU, A.B.; ZHANG, H. L.; NUGENT, J. L.; BEASLEY, R. F.; MARTINU, T.; GWINN, W. M.; MORGAN, D. L.; PALMER, S. M. Diacetyl induces amphiregulin shedding in pulmonary epithelial cells and in experimental

bronchiolitis obliterans? **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 51, n. 4, p. 568-574, 2014.

KILIC, N.; BALKAN, E.; AKGOZ, S.; SEN, N.; DOGRUYOL, H. Comparison of the effectiveness and side-effects of tolterodine and oxybutynin in children with detrusor instability. **Internacional Journal of Urology**, v. 13, p. 105–108, 2006.

KIM, H. J.; KIM, M. R. Consumer attitudes towards food additives. **Journal of East Asian Soc Dietary Life**, v. 15, n. 1, 126-135, 2005.

KREISS, K. Flavoring-related bronchiolitis obliterans. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 1, n.7, p.162–167, 2007.

IWASAKI, K.; TSURUTA, H. Molecular mechanism of hexane neuropathy: significant differences in pharmacokinetics between 2.3-, 2.4-, and 2.5-hexanedione. **Industrial Health**, v. 22, n. 3, p. 177-187, 1984.

KONISHI, Y.; HAYASHI, S.; FUKUSHIMA, S. Regulatory forum opinion piece\*: Supporting the Need for International Harmonization of Safety Assessments for Food Flavoring Substances. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 6, p. 949-953, 2013.

KWORD, R. H. M. Chinese-restaurant syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 278, p. 796, 1968.

LEE, J. S. Perception on nutrition labeling of the processed food among elementary school teachers in Busan. **Korean Journal of Community Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 430- 440, 2009.

LENNERZ, B. S.; VAFAI, S. B.; DELANEY, N. F.; CLISH, C. B.; DEIK, A. A.; PIERCE, K. A., LUDWIG, D. S.; MOOTHA, V. K. Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 114, n. 1, p. 73-79, 2015.

SILVA, S. I. O.; SANTANA, G. M.; SALES, I. M. S.; SOUSA, J. M. C.; PERON, A. P. Toxicity in food flavorings at the cellular level associated with each other at different doses. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 1, p. 77-84, 2016.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; GUTIERREZ-PRAENA, D. PICHARDO, S.; MORENO, F. J.; BERMÚDEZ, J. M.; AUCEJO, S.; CAMEÁN, A. M. Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. **Food Chem Toxicol**, v. 64, p. 281-290, 2014.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte**, 2º Edição. Editora Funep: Jaboticabal, 2002.

MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Sulfito em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.

MARTINEZ-TOME, M.; JIMENEZ, A. M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. A. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection, Des Moines**, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

MAMUR, S., YÜZBASIOGLU, D., ÜNAL, F., & YILMAZ, S. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 3, p. 790-794, 2010.

McCANN, D.; BARRETT, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L.; GRIMSHAW, K.; KITCHIN, E.; LOK, K.; PORTEOUS, L.; PRINCE, E.; SONUGA\_BARKE, E.; WARNER, J. O.; STEVENSON, J.; Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 3; n. 370, p. 1560-7, 2007.

MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; SILVA, Z. A.; BARBOSA, R. C.; MARQUES, A. V. M. S.; NOGUEIRA, F. R.B. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachia* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 17-20, 2003.

MCLAIN, A. L.; SZWEDA, P. A.; SZWEDA, L. I.  $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor. **Free radical research**, v. 45, n. 1, p. 29–36, 2011.

MILLER, A. G.; GERRARD, J. A. Assessment of protein function following cross-linking by alpha-dicarbonyls. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 195-200, 2005.

MIRVISH, S. S. N-nitroso compounds, nitrite, and nitrate: possible implications for the causation of human cancer. **Proceedings of the Conference on Nitrogen As a Water Pollutant**, v. 8, n. 4, p. 195–207, 2013.

MOUTINHO, I. L. D.; BERTGES, L. C.; ASSIS, R. V. C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n° 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n.1, p. 141-145, 2007.

MORE, S. S.; VARTAK, A. P.; VINCE, R. The butter flavorant diacetyl, exacerbates beta-amyloid cytotoxicity. **Chemical Research Toxicology**, v. 25, n. 10, p. 2083-2091, 2012.

MORGAN, D. L.; JOKINEN, M. P.; PRICE, H. C.; GWINN, W. M.; PALMER, S. M., FLAKE, G. P. Bronchial and bronchiolar fibrosis in rats exposed to 2,3-pentanedione vapors: implications for bronchiolitis obliterans in humans? **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 3, p. 448-465, 2012.

MOORADIAN, A.D.; SMITH, M.; TOKUDA, M. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: a narrative review. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 18, p. 1-8, 2017.

- MUKHERJEE, A.; CHAKRABARTI, J. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame K e A non-nutritive sweetener. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 12, p. 1177-1179, 1997.
- MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2390-2393, 2008.
- MPOUNTOUKAS, P.; PANTAZAKI, A.; KOSTARELI, E.; CHRISTODOULOU, P.; KARELI, D.; POLILIOU, S.; MOURELATOS, C.; LAMBROPOULOU, V.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2934-2944, 2010.
- MURAKAMI, K.; ISHIDA, K.; WATAKABE, K.; TSUBOUCHI, R.; HANEDA, M.; YOSHINO, M. Prooxidant action of maltol: Role of transition metals in the generation of reactive oxygen species and enhanced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA. **BioMetals**, v. 19, n. 3, p. 253-257, 2006.
- MURAKAMI, K.; HANEDA, M.; MAKINO, T.; YOSHINO, M. Prooxidant action of furanone compounds: Implication of reactive oxygen species in the metal-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1258-1262, 2007.
- NAIR, B. Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate. **International Journal of Toxicology**, v. 3, p. 23-50, 2001.
- NOORAFSHAN, A.; ERFANIZADEH, M.; KARBALAY-DOUST, S. Sodium benzoate, a food preservative, induces anxiety and motor impairment in rats. **Neurosciences**, v. 19, n. 1, p. 24-28, 2014.
- NTP (National Toxicology Program). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Sodium Nitrite (CAS NO. 7632-00-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Drinking Water Studies). National Toxicology Program Technical Report Series, v. 495, p. 7-273, 2001.
- PICCIN, J. S.; VIEIRA, M. L. G.; GONÇALVES, J. O.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Adsorption of FD&C Red No. 40 by chitosan: Isotherms analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 1, p. 16-20, 2009.
- PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.14, n.2, p. 237-250, 2003.
- POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.

QIU, S.; WANG, J. The prediction of food additives in the fruit juice based on electronic nose with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 230, p. 208-214, 2017.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.  
RAPOSA, B.; PÓNUSZ, R.; GERENCSÉR, G.; BUDÁN, F.; GYÖNGYI, Z.; TIBOLD, A.; HEGYI, D.; KISS, I.; KOLLER, Á.; VARJAS, T. Food additives: Sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine, and tartrazine modify the expression of NFκB, GADD45α, and MAPK8 genes. **Physiology International**, v.103, n. 3, p. 334–343, 2016.

REDDY, M. V.; ARUNA, G.; PARAMESWARI, S. A.; BANU, B. H.; REDDY, P. J. Estimated daily intake and exposure of sodium benzoate and potassium sorbate through food products in school children of tirupati, india. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 7, p. 129–133, 2015.

REGULAMENTO. REGULAMENTO (CE) N. 1333/2008 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. Jornal Oficial da União Europeia. Disponível em: <<http://www.ibravim.org.br/admin/arquivos/leis/1456260763.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

ROWE, K. S.; ROWE, K. J. Synthetic food coloring and behavior: a dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. **Journal of Pediatrics**, v. 125, n. 5 Pt 1, p. 691- 698, 1994.

SAHU, S. C. Food additives: A special issue of the journal Food and Chemical Toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, n. Part b, p. 529, 2017.

SALES, I. M. S.; BARBOSA, J. S.; SANTOS, F. K. S.; SILVA, F. C. C.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Acute Toxicity of Grape, Plum and Orange Synthetic Food Flavours Evaluated in in vivo Test Systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 131-137, 2017a.

SALES, I. M. S.; SANTOS, F. K. S.; CASTRO E SOUSA, J. M.; PERON, A. P. Toxicidade aguda em nível celular de aromatizantes de Biscoito e Tuğ -fruta em associação. **Multitemas**, v. 22, n. 51, p. 253-267, 2017b.

SALES, I. M. S.; BARBOSA, J.; SILVA, J. M.; MOURA, E. S.; SOUSA, J. M. C. E.; PERON, A. P. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. **Brazilian Journal of Biology**, p. 13, 2017c.

SALES, I. M. S.; SANTOS, F. K. S.; PERON, A. P. Citogenotoxicidade de aromatizantes utilizados na fabricação de alimentos industrializados. **Caderno de Pesquisa**, v. 29, n. 3, p. 30-38, 2017.

SASAKI, Y. F.; KAWAQUCHI, S.; KAMAYA, A.; OSSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIQUCHI, 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, n. 1-2, p.103-119, 2002.

SHARMA, A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. **Journal Biomedical Science**, v.22, p.93, 2015.

SHANKAR, P.; AHUJA, S.; SRIRAM, K. Non-nutritive sweeteners: review and up date. **Nutrition**, v. 29, n. 11-12, p. 1293-1299, 2013.

SHIM, S. M.; SEO, S. H.; LEE, Y.; MOON, G. L.; KIM, M. S.; PARK, J. H. C. Consumers' knowledge and safety perceptions of food additives: Evaluation on the effectiveness of transmitting information on preservatives. **Food Control**, v. 22, n. 7, p. 1054-1060, 2011.

SILVIA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da spirulina platensis**. 2008. 91f. Dissertação (Pós Graduação). Universidade Federal do Paraná. 2008.

SMITH, R. L.; COHEN, S. M.; DOULL, J.; FERON, V. J.; GOODMAN, J. I.; MARNETT, L. J.; MUNRO, I. C.; PORTOGHESE, P. S.; WADDELL, W. J.; WAGNER, B. M.; ADAMS, T. B. Criteria for the safety evaluation of flavoring substances. The Expert Panel of the Flavor and Extract Manufacturers Association. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 8, p. 1141-1177, 2005.

SMITH, R. L.; WADDELL, W. J.; COHEN, S. M.; FERON, V. J.; MARNETT, L. J.; PORTOGHESE, P. S.; RIETJENS, I. M. C. M.; ADAMS, T. B.; LUCAS GAVIN, C.; MCGOWEN, M. M.; TAYLOR, S. V.; WILLIAMS, M. C. GRAS: **Flavoring Substances 24**. 2009. Disponível em: <[http://www.ift.org/~media/Food%20Technology/pdf/2009/06/0609feat\\_GRAS24text.pdf](http://www.ift.org/~media/Food%20Technology/pdf/2009/06/0609feat_GRAS24text.pdf)>. Acesso em: 25 Nov. 2017.

SOARES, B. M. S.; ARAÚJO, T. M. T.; RAMOS, J. A. B. 1.; PINTO, L. C.; KHAYAT, B. M.; BAHIA, M. O.; MONTENEGRO, R. C.; BURBANO, R. M. R.; KHAYAT, A. S. Effects on DNA Repair in Human Lymphocytes Exposed to the Food Dye Tartrazine Yellow. **Anticancer research**, v. 35, n. 3, p. 1465-1474, 2015.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; MANSERVIGI, M.; TIBALDI, E.; LAURIOLA, M.; FALCIONI, L.; BUA, L. Aspartame administered in feed, beginning pre-natally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 53, n. 12, p. 1197-1206, 2010.

SOMEYA, T. O procedimento de avaliação de segurança para substâncias aromatizantes no Japão: visão geral e uma perspectiva futura. **Ingredientes Comidas J**, v. 217, p. 151-156, 2012.

SOUSA, J. J. A.; MARQUES, G.; SOUSA, J. M. C. E.; PERON, A. P. Action of Ponceau 4R (E-124) food dye on the root meristematic cells of *Allium cepa* L.. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 37, n. 1, p. 101-106, 2015.

STOHS, S.J.; MILLER, M.J.S. A case study involving allergic reactions to sulfurcontaining compounds including, sulphite, taurine, acesulfame potassium and sulonamides. *Food and Chemical Toxicology*, v. 63, p. 240-243, 2014.  
SUH, H.; CHO, Y.; CHUNG, M.; KIM, B. Preliminary data on sulphite intake from the Korean diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 5, p. 212-219, 2007.

TABAR, A. I.; ACERO, S.; ARREGUI, C.; URDANOZ, M.; QUIRCE, S. Asma y alergia por el colorante carmín. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, v. 26, n. Supl. 2, p. 65-73, 2003.

TAHA, A. S.; ELDAHSHAN, O. A. Chemical Characteristics, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of Egyptian *Cinnamomum glanduliferum* Bark. *Chemical & Biodiversity*, v. 14, n. 5, 2017.

TAKEDA, M.; OYAMA, K.; KAMEMURA, N.; KANEMARU, K.; YUASA, K.; YOKOIGAWA, K.; OYAMA, Y. Change in plasma membrane potential of rat thymocytes by *tert*-butylhydroquinone, a food additive: Possible risk on lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, n. Pt 1, p. 296-301, 2017.

THE UK FOOD GUIDE. **E210 benzoic acid**. 2013. Disponível em: <<http://www.ukfoodguide.net/e210.htm>>. Acesso em: 20 novembro 2013.

THIAM, A.; ZHOU, M.; BRILLAS, E.; SIRÉS, I. Two-step mineralization of Tartrazine solutions: study of parameters and by-products during the coupling of electrocoagulation with electrochemical advanced oxidation processes. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 150–151, p. 116-125, 2014.

TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 5, p. 267-275, 2007.

OLIVEIRA, M. J.; ARAUJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. *Ciências de Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.

OLIVEIRA, V. A.; OLIVEIRA, V. M. A.; OLIVEIRA, T. W. N.; DAMASCENO, A. N. C.; SILVA, C. E. O.; MEDEIROS, S. R. A.; SOARES, B. M.; SILVA, F. C. C.; AGUIAR, R. P. S.; ISLAM, M. T.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; PERON, A. P.; CASTRO E SOUSA, J. M.; Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of two artificial sweeteners by using eukaryotic test systems. *African Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 11, p. 547-551, 2017.

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.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos Naturais Bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WEIHRAUCH, M. R.; DIEHL, V. Artificial sweeteners-do they bear a carcinogenic risk? **Annals of Oncology**, v. 15, n. 10, p. 1460-1465, 2004.

WHITTAKER, P.; JANE, J.; CLARKE, R. H. C.; TIMOTHY, H. B.; VIRGINIA, C. D. Evaluation of the butter flavoring chemical diacetyl and a fluorochemical paper additive for mutagenicity and toxicity using the mammalian cell gene mutation assay in L5178Y mouse lymphoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n. 8, p. 2928-2933, 2008.

WHO (World Health Organization). Food Additives Series. Ed. 50. Safety Evaluation of Certain Food Additives. Fifty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 2003.

WHO, World Health Organization. **Food additives**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/food-additives/en/>>. Acesso em: 09 de nov de 2017.

WORM, M.; VIETH, W.; EHLERS, I.; STERRY, W.; ZUBERBIER, T. Increased leukotriene production by food additives in patients with atopic dermatitis and proven food intolerance. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 31, n. 2, p. 265-273, 2001.

YADAV, A.; KUMAR, A.; DAS, M.; TRIPATHI, A. Sodium benzoate, a food preservative, affects the functional and activation status of splenocytes at non cytotoxic dose. **Food and Chemical Toxicology**, v. 88, p. 40-47, 2016.

YASHIN, A.; YASHIN, Y.; XIA, X.; NEMZER, B. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 70, 2017.

ZACCONE, E.J.; GOLDSMITH, W.T.; SHIMKO, M.J.; WELLS, J.R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; WILLARD, P.A.; CASE, S.L.; THOMPSON, J.A.; FEDAN, J.S. Diacetyl and 2,3-pentanedione exposure of human cultured airway epithelial cells: ion transport effects and metabolism of butter flavoring agents. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 542-549, 2015.

ZENGIN, N.; YUZBASIOGLU, D.; UNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOV, H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 763-769, 2011.



## **CAPÍTULO II**

**Os aromatizantes líquidos salgados são substâncias antitumorais *in vitro*?**

**(Publicado: Anais de Academia Brasileira de Ciências - *Qualis B2*)**

## **Os aromatizantes líquidos salgados são substâncias antitumorais *in vitro*?**

Francisco Ronielson de Sousa Carvalho<sup>1</sup>, Antonio Gabriel de Moura<sup>1</sup>, Gardenia Ferreira Rodrigues<sup>1</sup>, Narcia Mariana Fonseca Nunes<sup>2</sup>, Daisy Jereissati Barbosa Lima<sup>3</sup>, Claudia Pessoa<sup>3</sup>, Marcilia Pinheiro da Costa<sup>2,4</sup>, Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>2,5</sup> and Ana Paula Peron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí, Rua Cícero Duarte, 905 64607-670, Picos, Piauí, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Avenida Universitária, lado ímpar 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Avenida Universitária, lado ímpar 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>5</sup>Laboratório de Cancerologia Experimental, Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, Avenida Universitária, lado ímpar 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antiproliferativo, citotóxico e genotóxico de aromas sintéticos líquidos salgados de manteiga, queijo cheddar e cebola. O potencial antiproliferativo (2,9-1500 µg/mL) foi avaliado pelo teste de MTT após 72 h utilizando as linhagens tumorais humanas SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (carcinoma de cólon) e HL-60 (leucemia promielocítica) e cultura primária murino de Sarcoma 180 (S180) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Bulbos de *Allium cepa* foram expostos a doses crescentes (1 mL e 2 mL). Somente os aromas de manteiga e queijo cheddar revelaram atividade citotóxica contra células tumorais, com valores de  $CI_{50}$  variando entre 125,4 µg/mL (cheddar - HCT-116) e 402,6 µg/mL (manteiga - OVCAR-8). O aromatizante de manteiga foi o mais citotóxico em PBMC (136,3 µg/mL) e aumentou a taxa de divisão celular em relação ao índice mitótico, mas não causou aberrações celulares. Os aromatizantes de cebola e cheddar reduziram o índice mitótico depois de 24 h e 48 h de exposição, mas somente o de cebola resultou em aberrações celulares e anormalidades do fuso mitótico, tais como pontes telofásicas e anafásicas, células micronucleadas, metáfases-cochicínicas e ampliações. Então, os aromatizantes de manteiga, cebola e cheddar causaram mudanças significativas na divisão de células meristemáticas de *A. cepa* e apresentaram ação citotóxica até mesmo em células tumorais humanas em proliferação descontroladas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aditivos alimentares, *Allium cepa*, ação antiproliferativa, células tumorais, toxicidade.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the antiproliferative, cytotoxic and genotoxic potential of salty liquid synthetic flavorings of Butter, Cheddar Cheese and Onion. The antiproliferative potential (2.9-1500 µg/mL) was assessed by MTT assay after 72 h using the human tumor lines SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovarian carcinoma), HCT-116 (colon carcinoma) and HL-60 (promyelocytic leukemia) and primary cultures of murine Sarcoma 180 (S180) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Allium cepa* bulbs were exposed to growing respective doses (1 mL and 2 mL). Only Butter and Cheddar flavorings revealed cytotoxic activity on cancer cells, with IC<sub>50</sub> values ranging from 125.4 µg/mL (cheddar - HCT-116) to 402.6 µg/mL (butter - OVCAR-8). Butter flavoring was the most cytotoxic on PBMC (136.3 µg/mL) and increased cell division rate in relation to the mitotic index but did not cause cellular aberrations. Onion and Cheddar flavorings reduced the mitotic index after 24 h and 48 h exposure, but only Onion flavoring resulted in cellular aberrations and mitotic spindle abnormalities, such as anaphase and telophase bridges, micronucleated cells, conchicine-metaphases and amplifications. So, Butter, Onion and/or Cheddar flavorings caused significant changes in the division of meristematic cells of *A. cepa* and presented cytotoxic action even on decontrolled proliferating human tumor cells.

**KEYWORDS:** food additives, *Allium cepa*, antiproliferative action, neoplastic cells, toxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

Os aditivos alimentares são compostos intencionalmente adicionados, sem benefício nutricional, com o propósito de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais dos produtos alimentares. Entre estes, as substâncias aromatizantes tem propriedades sensoriais que proporcionam sabor e aroma a vários tipos de alimentos (CONSTANTE et al., 2007). Eles têm formulação química complexa, incluindo diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsionantes, estabilizantes, reguladores de acidez, intensificadores de sabor, agentes antiespumantes, agentes anti-aglomerantes, corantes, solventes para extração e processamento, aprovados pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e pela Agência Nacional de Vigilância Nacional de Saúde (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA).

Além disso, dada a sua constituição química, os aromatizantes são considerados uma controvérsia no progresso da indústria alimentar, uma vez que muitos especialistas da saúde sugerem que esses aditivos, bem como corantes, contribuem significativamente para o empobrecimento da dieta e para o desencadeamento de doenças (CHEESEMAN, 2012). Desta forma, os pesquisadores relatam que o uso de substâncias aromatizantes, principalmente as sintéticas, suscita uma série de questões relativas à toxicidade em nível celular e sistêmico, e apontam para a necessidade urgente de estudos que avaliam seu potencial tóxico. A ANVISA (2007) declara ser uma prioridade a melhoria na segurança sobre o uso de aditivos na formulação de alimentos.

Neste contexto, os métodos citotóxicos revolucionaram o rastreio de substâncias ativas baseado em células, oferecendo ensaios colorimétricos de triagem de alto rendimento e simplificou o processamento de amostras que não requerem radioisótopos, sendo suficientemente sensíveis para formatos miniaturizados, como o uso de placa de 96 e/ou 384 poços visto em ensaios de MTT, ATP e Alamar Blue. Estes métodos têm sido muito utilizados na busca de novas substâncias com atividade antiproliferativa e potencial tóxico (SKEHAN et al., 1990; AL-NASIRY et al., 2007; LEITE et al., 2014; FERREIRA et al., 2015; MONÇÃO et al., 2015).

Bioensaios vegetais são considerados altamente sensíveis e métodos simples para o monitoramento dos efeitos citotóxicos e genotóxicos de

compostos químicos (IGANCI et al., 2006). O método do *Allium cepa* (cebola), usando regiões meristemáticas de raiz, é indicado como um organismo teste eficaz para avaliar a toxicidade a nível celular (CARITÁ E MARIN-MORALES, 2008). Este sistema de teste possui excelentes propriedades cinéticas de proliferação, grandes e poucos cromossomas ( $2n = 16$ ), o que facilita a detecção de aberrações celulares (HERRERO et al., 2012) e permite verificar alterações na divisão celular (índice mitótico), como aumento ou diminuição das taxas de proliferação celular em tecidos expostos a produtos químicos de interesse (TABREZ et al., 2011). Nesse contexto, este estudo avaliou a citotoxicidade e genotoxicidade de aromas sintéticos alimentares de manteiga, cebola e queijo cheddar em células vegetais e tumorais humanas e murinas. Esses aromatizantes foram escolhidos por causa de seu amplo uso na indústria de alimentos, especialmente na produção de alimentos congelados, e devido ao seu elevado consumo pela população.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Produtos Químicos**

Os aromatizantes sintéticos líquidos salgados de manteiga, queijo cheddar e cebola, idênticos ao natural, foram adquiridos de um varejista especializado na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos localizados no Nordeste do Brasil, na cidade de Teresina, Piauí. Os aromas, com aspecto oleoso, foram embalados em garrafas de cor âmbar com uma capacidade de 100 mL. Doxorubicina e Alamar Blue™ (Resazurina) foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os aromatizantes foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 50 mg/mL (solução estoque).

### **2.2 Ensaio Antiproliferativo *in vitro***

O potencial antiproliferativo dos aromas sintéticos líquido de salgado foi avaliado após 72 h exposição usando as linhagens humanas SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (carcinoma de cólon), HL-60 (leucemia promielocítica), culturas primárias de células do Sarcoma 180 (S180) e de células mononucleares de sangue periférico humano (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC).

As linhagens foram cultivadas em frascos plásticos para cultura do tipo Corning (25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em incubadora de células (Shel Lab CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator<sup>®</sup>, Estados Unidos) à 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h.

A quantificação da proliferação celular (2,9-1.500 µg/mL) foi determinada por espectrofotometria, utilizando um leitor multiplacas (Detector Multimodo DTX 880, Beckman Coulter), a um comprimento de onda de 595 nm para ensaio de MTT e a comprimento de onda de 570 e 595 nm para o ensaio Alamar Blue. Os grupos controles (positivos e negativos) receberam a mesma quantidade de DMSO (0,1%). Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo (0,005-5,0 µg/mL).

### **2.2.1 Avaliação da atividade citotóxica contra as linhagens celulares tumorais humanas**

A citotoxicidade contra diferentes tipos histológicos de câncer humano foi avaliada utilizando o método de MTT (Mosmann, 1983), que analisa a capacidade de células vivas para reduzir o corante amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-brometo de 2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a um produto de formazan púrpura. Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (0,3-0,7 x 10<sup>5</sup> células/poço) e incubadas para permitir a adesão celular. Após 24 h de incubação, as substâncias previamente dissolvidas em DMSO puro e estéril foram adicionadas às placas (2,9-1500 µg/mL).

Após 69 h de incubação, as placas foram removidas e centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 µL de solução de MTT de 10% em meio RPMI 1640. As placas foram então incubadas a 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado foi resuspenso em 150 µL de DMSO puro e agitou-se durante cerca de 10 minutos até a completa dissolução dos cristais de formazan. A leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro de placa (880 DTX Multimode Detector, Beckman Coulter) a 595 nm.

### **2.2.2 Avaliação *in vitro* no tumor murino Sarcoma 180**

Camundongos *Swiss* fêmeas adultos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) foram obtidos a partir do biotério da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Brasil. Eles foram mantidos em gaiolas bem ventiladas sob condições padrão de luz (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura ( $27 \pm 2$  °C) e foram alojados com acesso livre a dieta comercial para roedores (Nutrilabor, Campinas, Brasil).

Células tumorais S180 foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará desde meados dos anos 1980 e uma amostra do tumor foi doada para o nosso laboratório – Laboratório em Pesquisa de Cancerologia Experimental (LabCancer™) – na UFPI. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (Processo nº 008/2015) e seguiram-se as normas brasileiras (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA) e internacionais sobre o cuidado e uso de animais de laboratório (EEC, 1986).

Camundongos portadores de tumor ascítico entre 7 e 9 dias após a inoculação foram sacrificados por deslocamento cervical e uma suspensão de células de sarcoma 180 foi colhido a partir da cavidade intraperitoneal, sob condições assépticas. A suspensão foi centrifugada a  $500 \times g$  por 5 min para se obter um *pellet* de células e lavou-se três vezes com meio RPMI. A concentração celular foi ajustada para  $0,5 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 suplementado, e as células foram plaqueadas numa placa de 96 poços e incubadas com os aromatizantes [(2,9-1.500 µg/mL). A proliferação celular foi determinada pelo ensaio Alamar Blue após 72 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Vinte e quatro horas antes do final da incubação, 20 µL de uma solução de estoque (0,156 mg/mL) de azul de Alamar Blue™ foram adicionadas a cada poço. A absorbância foi medida a 570 nm e 595 nm, e o efeito da substância teste foi quantificada como a percentagem de controle (FERREIRA et al., 2011).

### **2.2.3 Estudo antiproliferativo em células mononucleares do sangue periférico pelo ensaio Alamar Blue**

O sangue humano heparinizado (de doadores saudáveis, não-fumantes, que não tinham tomado qualquer medicamento por, pelos menos, 15 dias antes



da coleta, entre 18-35 anos de idade) foi recolhido e PBMC foram isoladas por um método padrão de centrifugação com gradiente de densidade sobre Ficoll-Hypaque. As PBMC foram lavadas e resuspendidas ( $3 \times 10^5$  células/mL) em meio RPMI 1640 suplementado e fito-hemaglutinina (4 %). Em seguida, as PBMC foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço). Após 24 h, os aromatizantes foram adicionados a cada poço (2,9-1.500  $\mu\text{g/mL}$ ) e as células foram incubadas durante 72 h. Vinte e quatro horas antes do final da incubação, 10  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar Blue™ foi adicionado a cada poço (Ferreira et al., 2015). A absorbância foi medida como descrito anteriormente. Todos os estudos foram realizados de acordo com diretrizes brasileiras (Lei 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, Brasil) e com a Declaração de Helsinque.

#### **2.2.4 Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa***

As recomendações de fabricação relatam o uso de 1 mL de aromatizante em 300 g de massa. Assim, o teste *A. cepa* foi realizado usando bulbos de cebola, com um peso médio de 300 g e aromatizantes nas doses de 1 e de 2 mL.

##### **2.2.4.1 Células de meristema de raiz para análise citogenética**

Bulbos de *A. cepa* foram colocados em garrafas com água destilada à temperatura ambiente (25 °C), arejada, até a obter raízes de cerca de 2 cm de comprimento. Para a análise de cada dose (tratamento), um grupo experimental com cinco bulbos foi estabelecido. Antes de colocar as raízes em contato com as respectivas doses, algumas raízes foram recolhidas e fixadas para funcionar como controle do próprio bulbo.

As raízes restantes com cinco bulbos de cada avaliação das doses foram colocadas nas respectivas soluções durante 24 h, compreendendo o tempo de exposição de 24 h (TE 24 h). Logo após, algumas raízes foram removidas e fixadas. As raízes remanescentes de cada ampola foram devolvidas as suas respectivas soluções e mantiveram-se durante mais 24 h, compreendendo o tempo de exposição de 48 h (TE 48 h). Após este período, as raízes foram colhidas e fixadas novamente. Os tempos de exposição de 24

e 48 h foram escolhidos para avaliar os efeitos dessas doses em mais de um ciclo celular. Todas as raízes estiveram em contato direto com a solução de teste. As raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético) à temperatura ambiente durante 24 h. Para cada coleta, foram usadas três raízes por bulbo.

#### **2.2.4.2 Preparação e leitura de lâminas**

Em média, três lâminas foram montadas por bulbo, seguindo o método de Guerra; Souza (2002). Cada lâmina foi corada com duas gotas de 2%orceína acética e examinada sob um microscópio de luz com magnitude de 400X. A soma de 1.000 células foi analisada para cada bulbo, num total de 5000 células por grupo (controle e tratados).

Foram analisadas as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. O número de células na interfase e na divisão foi calculado para cada controle e tempo de exposição para determinar o índice mitótico (IM). O efeito das doses aromatizantes também foi avaliado pela quantificação de células com micronúcleos, C-metáfases, pontes na anáfase e telófase, amplificação gênica, células com adesão, botões nucleares e anáfase multipolar.

### **2.3 Análises Estatísticas**

Para ensaios de citotoxicidade, os valores de IC<sub>50</sub> e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por regressão não linear, utilizando o programa Graphpad (Prisma 5.0, Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Todos os estudos *in vitro* foram realizados em duplicata representado por avaliações biológicas independentes (n= 2). Os resultados com *Allium cepa* foram analisados pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significante quando p <0,05.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Novas perspectivas dificilmente indicavam a necessidade de avaliações toxicológicas e celulares de aromatizantes e flavorizantes como uma forma de repensar, desenvolver e reorganizar, com base nas novas descobertas, novos documentos técnicos por parte das agências reguladoras que normatizam a utilização de aditivos alimentares (KONISHI et al., 2011). No presente estudo,

primeiramente, avaliou-se a atividade citotóxica de substâncias aromatizantes em quatro linhagens de células tumorais utilizando MTT. MTT é um método rápido, sensível e de baixo custo para analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula baseada na conversão do sal amarelo MTT para um cristal azul arroxeadado por enzimas mitocondriais de células metabolicamente ativas (SKEHAN et al., 1990). Conforme descrito na **Tabela 1**, apenas os aromatizantes de queijo cheddar e manteiga mostraram atividade citotóxica com valores de IC<sub>50</sub> que variam de 125,4 µg/mL (cheddar - HCT-116) a 402,6 µg/mL (manteiga - OVCAR-8), embora nenhum deles tenha revelado citotoxicidade contra as células leucêmicas. Também foi verificada a ação antiproliferativa em cultura primária de PBMC após 72 h de incubação. O aromatizante de manteiga foi o mais citotóxico sobre leucócitos normais humanos [136,3 (111,3-167,0) µg/mL].

**Tabela 1** – Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos aromatizantes sabor de cebola, cheddar e manteiga em linhagens cancerosas humanas por ensaio de MTT e na cultura primária de células de Sarcoma 180 (S180) e em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) quantificadas pelo teste de Alamar Blue após 72h de incubação.

Aromatizante	IC <sub>50</sub> (µg/mL)*					
	SF-295	OVCAR-8	HL-60	HCT-116	S180	PBMC
Cebola	> 1500	> 1500	> 1500	> 1500	> 1500	> 1500
Queijo Cheddar	301,8	385,8	> 1500	125,4	> 1500	> 1500
	248,3 – 366,8	332,3 – 448,2		102,1 – 154,0		
Manteiga	402,6	383,2	> 1500	250,7	> 1500	136,3
	305,1 – 531,3	313,4 – 468,7		194,1 – 323,9		111,3 – 167,0
Doxorubicina	0,2	0,3	0,02	0,1	1,9	0,97
	0,13 – 0,23	0,17 – 0,31	0,01 – 0,02	0,09 – 0,17	1,4 – 2,4	0,52 – 1,80

\* Os dados são apresentados como valores de IC<sub>50</sub> e intervalos de confiança de 95% para linhagens tumorais de leucemia (HL-60), câncer de cólon (HCT-116), glioblastoma (SF-295) e carcinoma de ovário (OVCAR-8), para Sarcoma 180 e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanos. A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. Experimentos foram realizados em duplicata.

Na tentativa de prognosticar a ação antitumoral *in vivo*, determinou-se também a atividade em células de sarcoma 180 utilizando o ensaio Alamar Blue. Esta metodologia incorpora um indicador de crescimento fluorométrico/colorimétrico com base na detecção de atividade metabólica. Especificamente, o sistema incorpora um indicador de oxidação-redução que floresce e muda de cor em resposta à redução química do meio de crescimento quando ocorre o crescimento celular. Esta técnica tem sido amplamente utilizada para avaliar diferentes tipos de células em testes de suscetibilidade toxicológica, ambiental, antimicrobiana e citotóxica. Ela apresenta maior sensibilidade quando comparada com outros ensaios de citotoxicidade, uma vez que é necessária uma menor quantidade de células e menos etapas, o que a torna um método adequado para avaliar a proliferação em culturas primárias de células normais e de tumorais de camundongos, ratos e seres humanos (AL-NASIRY et al., 2007; RAMPERSAD et al., 2012; SCHOONEN et al., 2012; BEZERRA et al., 2015; FERREIRA et al., 2015). Assim, após os estudos, não foi encontrada ação antiproliferativa dos aromatizantes contra células de S180, exibindo resultados negativos como aqueles encontrados com células da leucemia HL-60 (**Tabela 1**). Isso pode ser explicado, em parte, pela especificidade antiproliferativa sobre tipos celulares, a qual é observada com substâncias na forma de misturas complexas de compostos, o que provavelmente deve-se à presença de diferentes classes químicas (CRAGG et al., 1994). Por isso, o uso de mais de uma linhagem celular é considerada necessária para a detecção de substâncias com ação citotóxica.

Uma vez que as células de S180 são mantidas na cavidade peritoneal de camundongos, é provável que o seu comportamento seja semelhante ao apresentado por células que crescem em suspensão como da linhagem HL-60. Talvez, os aromatizantes estejam interferindo na adesão celular à matriz extracelular (MEC) (neste caso, é o plástico do frasco), causando ação citotóxica. A adesão à MEC é essencial para a sobrevivência e a propagação de células aderentes. A perda de adesão ativa a apoptose conhecida como *anoikis*. Anteriormente, alguns trabalhos com Brefeldina A (BFA), uma micotoxina que provoca estresse no retículo endoplasmático em células eucarióticas, mostraram que Brefeldina A induz, preferencialmente, a morte

celular em culturas de carcinoma da mama MDA/MB-231 em suspensão em comparação com linhagens aderentes (TSENG et al., 2014).

Embora os estudos de citotoxicidade *in vitro* usando o bioensaio MTT e técnicas semelhantes sejam eficazes na busca de novas substâncias com potencial antiproliferativo, tais técnicas não determinam o mecanismo de ação das substâncias em estudo (BERRIDGE et al., 1996). Então, para avaliar a ação desses 3 aromatizantes, utilizaram-se células meristemáticas de raiz de *A. cepa* para obter dados mais detalhados sobre a toxicidade a nível celular. Este sistema de teste é amplamente usado no rastreamento de citotoxicidade e genotoxicidade de produtos químicos (Herrero et al., 2012) e tem similaridade satisfatória para resultados com outros organismos teste (ARUNG et al., 2011; GOMES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

A **Tabela 2** descreve o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular e os valores do índice mitótico de células de *A. cepa* do meristema radicular tratados com aroma de manteiga. Houve um aumento significativo na taxa de divisão celular em relação ao IM em todas as doses e tempos testadas em comparação com o controle. Nenhuma das doses causou aberrações celulares ou interferiu no IM entre a exposição 24 h e 48 h uma vez que as alterações mitóticas do fuso ou micronúcleos não são observadas ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2** – Número total de células analisadas no ciclo celular do meristema de raiz de *Allium cepa* após tratamento com 1 e 2 mL do aromatizante sabor manteiga nos tempos de exposição de 24 e 48 h.

Dose	TE	Células Indiferenciadas /Intérfase	P	M	A	T	Células em divisão	IM (%)
1 mL	C	4,464	202	187	82	65	536	10,7
	24 h	3,711	438	397	301	153	1,289	25,8*
	48 h	3,830	413	389	219	149	1,170	23,4*
2 mL	C	4,381	190	177	152	100	619	12,4
	24 h	3,892	345	289	271	203	1,108	22,2*
	48 h	3,830	392	279	298	201	1,170	23,4*

TE – Tempo de exposição; C – Controle negativo; IM – Índice mitótico. \*Os valores médios do IM foram analisados pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e foram significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

De acordo com Cavalcanti et al. (2012), o composto diacetil (2,3-butanodiona), um diluente usado em grandes quantidades na composição química do aromatizante Manteiga, causa bronquiolite obliterante, uma doença muito comum em trabalhadores de fábrica de pipoca de microondas, que bloqueia os bronquíolos e compromete a função pulmonar. Whittaker et al. (2008) analisaram o potencial mutagênico deste composto químico em um ensaio de mutação genética com células de linfoma de rato da linhagem L5178Y e observaram que o diacetil causou danos significativos no *loco* cromossômico 11 e causou perda funcional da enzima timidina quinase, o que levou à proliferação descontrolada de células de linfoma.

Altas doses de diacetil são citotóxicos devido ao seu potencial para substituir timina com guanina. Esta alteração pode afetar o controle da divisão celular (More et al., 2012), o que pode explicar, pelo menos em parte, o aumento na proliferação das células do meristema radicular. De fato, alguns estudos indicam que diacetil pode ser considerado um ativador tumorigênico. Similarmente, Potera et al. (2012), em um estudo com camundongos, descobriu que o diacetil induziu a proliferação de fibroblastos nos pulmões destes animais, devido ao aumento da expressão de genes responsáveis pela produção de citocinas. Assim, os resultados obtidos por More et al. (2012) e Potera et al. (2012) confirmam os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que as doses utilizadas estimularam um aumento significativo na divisão celular.

A **Tabela 3** apresenta o número de células em interfase e em diferentes estágios de divisão junto com valores do IM das células do meristema radicular de *A. cepa* tratadas com o aromatizante sabor cheddar. Observou-se que as doses de 1 mL e 2 mL do aromatizante Cheddar causaram redução dose dependente do IM após 24 h (15,0 e 6,5%) e 48 h (6,0 e 6,3%) de exposição, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Número total de células analisadas no ciclo celular do meristema de raiz de *Allium cepa* após tratamento com 1 e 2 mL do aromatizante sabor cheddar nos tempos de exposição de 24 e 48 h.

Dose	TE	Células Indiferenciadas /Intérfase					Células em divisão	IM (%)
			P	M	A	T		
	C	3,541	1205	116	85	53	1459	29,2
1 mL	24 h	4,249	544	107	44	56	751	15,0*
	48 h	4,702	114	106	43	35	298	6,0*
	C	3,426	465	55	32	22	1574	31,5
2 mL	24 h	4,777	213	57	31	22	323	6,5*
	48 h	4,685	282	18	07	08	315	6,3*

TE – Tempo de exposição; C – Controle negativo; IM – Índice mitótico. \*Os valores médios do IM foram analisados pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e foram significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

A **Tabela 4** mostra o número de células em interfase e em diferentes estágios da divisão celular e valores do índice mitótico das células do meristema da raiz de *A. cepa* tratadas com o aromatizante sabor de cebola (TE 24 e 48 h). Este aromatizante reduziu a divisão celular em 24 e 48 h da exposição para ambas as doses de 1 mL (3,5 e 2,1%) e 2 mL (2,5 e 2,6%), respectivamente ( $p < 0,05$ ). No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre as doses ( $p > 0,05$ ). Tanto no TE quanto nas doses, observou-se o aumento de células em prófase, especialmente após 48 h, sugerindo que o aromatizante sabor de cebola em tais condições interfere na formação ou na configuração do fuso mitótico.

**Tabela 4** - Número total de células analisadas no ciclo celular do meristema de raiz de *Allium cepa* após tratamento com 1 e 2 mL do aromatizante sabor de cebola nos tempos de exposição de 24 e 48h.

Dose	TE	Células indiferenciadas /Intérfase					Células em divisão	IM (%)
			P	M	A	T		
	C	4,561	161	105	82	91	439	8,8
1 mL	24 h	4,826	129	14	22	09	174	3,5*
	48 h	4,896	101	00	01	02	104	2,1*
	C	4,454	270	86	58	132	546	10,9
2 mL	24 h	4,874	101	16	09	00	126	2,5*
	48 h	4,871	124	05	0	00	129	2,6*

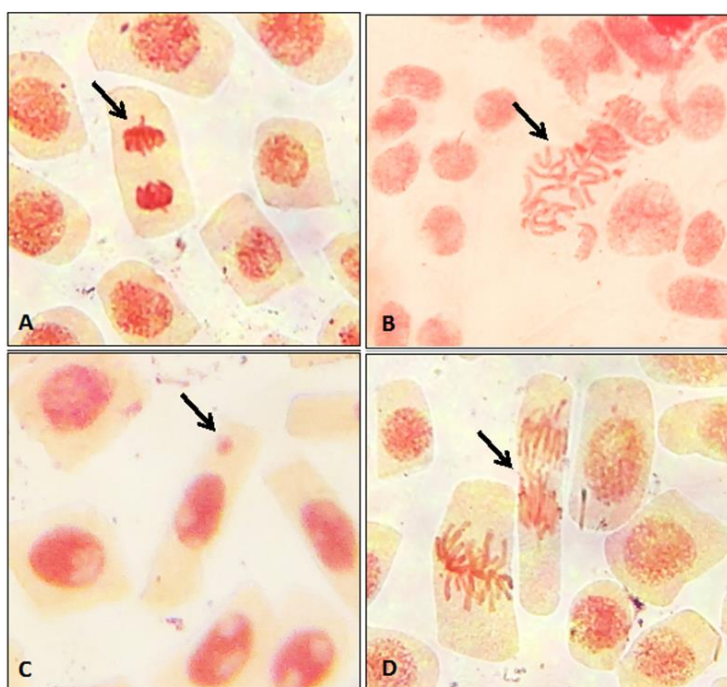
TE – Tempo de exposição; C – Controle negativo; IM – Índice mitótico. \*Os valores médios do IM foram analisados pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e foram significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .



A **Tabela 5** demonstra que os tratamentos com o aromatizante sabor de cebola em ambas as doses de 1 mL e 2 mL reduziu o índice mitótico (24 h: 3,5%, 48 h: 2,1% / 24 h: 2,5%, 48 h: 2,6%) e aumentou pontes anafásicas e telófase (48h: 13 e 24 h: 27), células micronucleadas (24 h: 113, 48 h: 125 / 24 h: 175, 48 h: 118), C-metáfase (48 h: 22 e 33) e ampliações (24 h: 67), respectivamente. Então, aberrações celulares [1 mL (24 h: 182, 48 h: 160); 2 mL (24 h: 202, 48 h: 153) foram mais elevadas quando comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ) (**Figura 1**).

**Tabela 5** - Número de pontes na anáfase e telófase, células micronucleadas, c-metáfase, ampliações e o número total de aberrações cromossômicas em cada controle e em doses de 1 e 2 mL do aroma sabor de cebola.

Dose	TE	Pontes anafásicas e telofásicas	Células micronucleadas	C-metáfase	Amplificações	Número total de aberrações celulares
1 mL	C	1	0	0	0	01
	24 h	0	113	2	67	182*
	48 h	13	125	22	0	160*
2 mL	C	1	0	0	0	01
	24 h	27	175	0	0	202*
	48 h	2	118	33	0	153*



**Figura 1** - Aberrações celulares e anormalidades do fuso mitótico causadas pelo aromatizante sabor de cebola em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* após 24 h e/ou 48 h de tratamento. A: anáfase tardia; B: cromossomo não alinhado na placa equatorial metafásica; C: micronúcleos; D: pontes na anáfase. Coloração com orceína acética e exame por microscópio de luz. Ampliação, 400X.

Portanto, o aromatizante sabor de cebola revelou atividade citotóxica, como demonstrada por altas taxas de atividade antiproliferativa e genotóxica, formação de micronúcleos e alterações do fuso mitótico das células vegetais. Estes resultados diferem daqueles obtidos com ensaios *in vitro* com células humanas e murinas, nas quais este aditivo alimentar não foi citotóxico. Não há estudos que avaliem a toxicidade a nível celular deste aromatizante alimentar.

Infelizmente, também não há dados sobre os constituintes químicos (e seus percentuais) nos aromatizantes. Poucos relatos descrevem estudos de toxicidade com os compostos encontrados nesses aditivos, embora hajam relatos de que sejam compostos clastogênicos, mutagênicos e citotóxicos em células normais do sangue periférico humano. Entre os aromatizantes, alguns deles inibem a proliferação microbiana, como o benzoato de potássio, benzoato de sódio e o nitrato de potássio (BRASIL, 1999; MPOUNTOUKAS et al., 2010,

ZEQUIN et al., 2011). Além disso, o ácido bórico, ácido cítrico, citrato de potássio e de sódio são citotóxicos em células meristemáticas de *A. cepa* (BRASIL, 1999; TÜKOĞLU, 2007). O álcool benzílico é, frequentemente, utilizado para manter a uniformidade e facilitar a incorporação e dispersão de sabores. Mostrou-se que elevadas concentrações de álcool benzílico promovem danos significativos ao fuso mitótico e, portanto, interferem na divisão celular de células sanguíneas humanas (DEMIR et al., 2010). No entanto, estes resultados não podem ser extrapolados para os resultados do presente estudo uma vez que os seus ingredientes não estão completamente determinados. É importante ressaltar que, para cada classe de aromatizantes e flavorizantes, cerca de trinta compostos químicos podem estar presentes (ANVISA, 2007). Entre estes, a classe com restrição de uso de alguns dos seus componentes é solvente para extrações, como o ácido agárico, aloína, berberina, cumarina, ácido hidrocianico, hipericina, pulegona, safrole e isosafrole, santonina e alfa e beta tujona que têm limites máximos toleráveis para aromatizantes alimentares (BRASIL, 1999). Além disso, os aromatizantes alimentares esparteína, hexanoato de alilo e quinino foram proibidos no início de 1980 devido a resultados de estudos de avaliação aguda e de longo prazo realizados em diferentes sistemas (KONISHI et al., 2011).

Estudos também demonstraram que aromatizante alimentares podem ser altamente tóxicos quando utilizados por períodos prolongados, promovendo hiperatividade em crianças com ou sem déficit de atenção (STEVENS et al., 2015), diminuição da hemoglobínia, alterações drásticas na função hepática, redução do ganho de peso corporal de ratos, alergias, hipersensibilidade cutânea, além de apresentarem pouca digestão no trato digestório de humanos (ANDERSON et al., 2013, VOLTOLINI et al., 2014). No entanto, no geral, os aromatizantes são pouco estudados do ponto de vista toxicológico, mas alguns estudos avaliaram a toxicidade a nível celular, diferentemente da maioria dos corantes utilizados na indústria alimentar, que foram amplamente estudados em diversos bioensaios e têm valores bem definidos de ingestão diária aceitável (IDA) (HONORATO et al., 2013).

No Brasil, a ANVISA (BRASIL, 2007) afirma que altas doses de aromatizantes podem causar ações irritantes e narcóticas e produzir toxicidade crônica no trato digestivo, à longo prazo, quando utilizados

indiscriminadamente. No entanto, esta agência reguladora, bem como a EFSA, não informa os limites de ingestão diária para estes aditivos e não relata as doses que são consideradas altas, nem que aromatizante provoca danos em células ou órgãos específicos.

Salinas (2002) também acredita que os aditivos alimentares tenham toxicidade celular à longo prazo. No entanto, como a ANVISA (2007), não determina quais são doses consideradas altas e baixas nem define o aromatizante que causa esse tipo de ação. Assim, embora o Ministério da Saúde e ANVISA permitam o uso de aromatizantes, é necessário e urgente desenvolver estudos para determinar os potenciais tóxicos e doses de segurança destes aromatizantes alimentares (HONORATO et al., 2013).

#### **4 CONCLUSÃO**

Os aromatizantes sabores de manteiga, cebola e/ou cheddar causaram mudanças significativas na divisão celular (e aberrações celulares) em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* e apresentaram ação citotóxica mesmo em células tumorais humanas. Portanto, é imprescindível realizar bioensaios suplementares para verificar, a nível celular, como esses aditivos promovem a morte em células de diferentes tipos de organismos [plantas e mamíferos (camundongos e humanos)].

## REFERÊNCIAS

- AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304-1309, 2007.
- ANDERSON, S. E.; FRANKO, J.; WELLS, J. R.; LUKOMSKA, E.; MEADE, B. J. Evaluation of the hypersensitivity potential of alternative butter flavorings. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 373- 381, 2013.
- ARUNG, E. T.; FURUTA, S.; ISHIKAWA, H.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Melanin biosynthesis inhibitory and antioxidant activities of quercetin-3'-O-beta-D-glucose isolated from *Allium cepa*. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 66, n. 5-6, p. 209-214, 2011.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemical**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; MACHADO, C. L.; AQUINO, N. C.; SILVEIRA, E. R.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C. Antitumour efficacy of *Piper tuberculatum* and Piplartine based on the Hollow Fiber Assay. **Planta Medica**, v. 81, n. 1, p. 15-19, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aroma**. Resolução N° 104 de 14 de maio de 1999. Disponível em: <[http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual\\_aditivos\\_aromatizantes.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual_aditivos_aromatizantes.htm)>. Acesso em: 13 abr. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada- RDC N. 05, de 15 de Janeiro de 2007**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf)>. Acesso em: 08 fev. 2015.
- BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. RESOLUÇÃO N° 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012. Disponível em: <[conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/reso466.pdf](http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/reso466.pdf)>. Acesso em: 15 mar. 2016.
- CARITA, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.
- CAVALCANTI, Z. R.; ALBUQUERQUE FILHO, A. P. L.; PEREIRA, C. A. C.; COLETTA, E. N. A. M. Bronquiolite associada a exposição a aroma artificial de

- manteiga em trabalhadores de uma fábrica de biscoitos no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 3, p. 395-399, 2012.
- CHEESEMAN, M. A. Artificial food color additives and child behavior. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 1, p. 15-16, 2012.
- CONSTANT, P. B. L.; STRINGUETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, p. 203-220, 2007.
- CRAGG, G. M.; BOYD, M. R.; CARDELLINA, J. H.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M.; MCCLOUD, T. G. Ethnobotany and drug discovery experience of the US National Cancer Institute. In: CHADWICK, D. J.; MARSH, J. (EDS), Ciba Foundation Ethnobotany and the search for new drugs. Chichester: J Wiley & Sons, p. 178-196, 1994.
- DEMIR, E.; KOCAOGLU, S.; KAYA, R. Assessment genotoxic effects of benzyl derivatives by comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1239-1242, 2010.
- EEC. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. **Official Journal of the European Communities**, L358, 1-29, 1986.
- FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A, F, U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais de Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011.
- FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J. B.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R. M.; FILHO, G. B. O.; FERREIRA, J. M.; QUEIROZ, M. G. R.; LEITE, A. C. L.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais de Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 313-330, 2015.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 213p, 2002.
- GOMES, K. M.; PERON, A. P.; OLIVEIRA, M. V. A.; CARVALHO, F. R. S. Cytotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tetracycline yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Science Technology**, v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.
- GONZALES, R. J.; TARLOFF, J. B. Evaluation of hepatic subcellular Alamar blue and MTT reductase activity. **Toxicol in Vitro**, v. 15, n. 3, p. 257-259, 2001.

- KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.
- HERRERO, O.; PEREZ, J. M.; FERNANDEZ, P. F.; CARVAJAL, L. L.; PEROPADRE, A.; ANDHAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, n. 1-2, p. 24-34, 2012.
- HONORATO, T. C.; BASTISTA, E.; NASCIMENTO, K. D. O. D.; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2013.
- IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.
- KONISHI, Y.; HAYASHI, S. M.; FUKUSHIMA, S. Regulatory forum opinion piece\*: supporting the need for international harmonization of safety assessments for food flavoring substance. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 6, p. 949-53, 2011.
- LEITE, A. C. L.; MOREIRA, D. R. M.; COELHO, L. C. D.; SILVA, E. B.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; SOUZA, V. M. O.; PEREIRA, V. R. A.; REIS, L. C.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C.; WANDERLEY, A. G.; MOTA, F. V. B.; SILVA, T. G. Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and immunomodulatory prototypes. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 4, p. 1701-1708, 2014.
- MONÇÃO, N. B. N.; ARAÚJO, B. Q.; SILVA, J. N.; LIMA, D. J. B.; FERREIRA, P. M. P.; AIROLD, F. P. S.; PESSOA, C.; CITÓ, A. M. G. L. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpinii* stem bark: possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpinii* on human tumour cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4204-4224, 2015.
- 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.
- MORE, S. C.; RAZA, A.; VINCE, R. The butter flavorant diacetyl forms a covalent adduct with 2-deoxyguanosine, uncoils DNA and leads to cell death. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 3311-3317, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid Calorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- 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**, v. 35, n. 4, p. 557-562, 2013.

POTERA, C. Food Additives: still searching for better butter flavoring. **Environmental Health Perspectives**, v. 20, p. 457, 2012.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

SALINAS, R. D. **Alimentos e Nutrição: Introdução a Bromatologia**. Porto Alegre: Artmed, p. 400, 2002.

SCHOONEN, W. G.; STEVENSON, J. C.; WESTERINK, W. M.; HORBACH, G. J. Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress™ and NAD(P)H production with Alamar Blue. **Toxicol in Vitro**, v. 26, n. 3, p. 511-525, 2012.

SKENHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; VISTICA, J. M. D.; WARREN, J. T.; BORESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. New calorimetric cytotoxicity for anticancer drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

STEVENS, L. J.; BURGESS, J. R.; STOCHESKI, M. A.; KUCZEK, T. Amounts of artificial food dyes and added sugars in food and sweets commonly consumed. **Clinical Pediatrics**, v. 54, n. 4, p. 309-321, 2015.

TABREZ, S.; SHAKIL, S.; UROOJ, M.; DAMANHOURI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; AHMAD, M. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an overview of the techniques and their efficacies. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v. 29, p. 250-275, 2011.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, n. 1-2, p. 4-14, 2007.

TSENG, C. N.; HONG, Y. R.; CHANG, H. W.; YU, T. J.; HUNG, T. W.; HOU, M. F.; YUAN, S. S.; CHO, C. L.; LIU, C. T.; CHIU, C. C.; HUANG, C. J. Brefeldin A reduces anchorage-independent survival, cancer stem cell potential and migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17464-17477, 2014.

VOLTOLINI, S.; PELLEGRINI, S.; CONTATORE, M.; BIGNARDI, D.; MINALE, P. New risks from ancient food dyes: cochineal red allergy. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, v. 46, n. 6, p. 232-233, 2014.

WHITTAKER, P.; CLARKE, J. J.; SAN, R. H.; BEGLEY, T. H.; DUNKEL, V. C. Evaluation of the butter flavoring chemical diacetyl and a fluorochemical paper additive for mutagenicity and toxicity using the mammalian cell gene mutation



assay in L5178Y mouse lymphoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2928-2933, 2008.

WROLSTAD, C. A.; CULVER, C. A. Alternatives to those artificial FD&C food colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 59-77, 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 and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 763-9, 2011.

### **CAPÍTULO III**

#### **Análise cromatográfica e perfil toxicológico de um aromatizante sintético sabor manteiga**

(Previsão de submissão: *Food and Chemical Toxicology – A2*)

## **Análise cromatográfica e perfil toxicológico de um aromatizante sintético sabor manteiga**

Nárcia Mariana Fonseca Nunes<sup>1</sup>, Jurandy do Nascimento Silva<sup>1,2</sup>, Carla Lorena Silva Ramos<sup>1,3</sup>, Edymilais da Silva Sousa<sup>4</sup>, Maria das Dores Alves de Oliveira<sup>4</sup>, Luciano da Silva Lopes<sup>1,5</sup>, Joaquim Soares da Costa Júnior<sup>1,2</sup>, Antonia Maria das Graças Lopes Citó<sup>1,3</sup>, Ana Paula Peron<sup>6</sup>, Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação e Tecnologia do Piauí, *Campus* Teresina Central, 64.000-040, Teresina, PI, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina, Piauí, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Laboratório de Geoquímica Orgânica, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>6</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, 64.067-670, Picos, Piauí, Brasil

## RESUMO

O Aromatizante sabor de manteiga (AM) é um dos aditivos alimentares muito utilizado na indústria alimentícia por conferir o sabor amanteigado aos alimentos. Apesar de ser nacional e internacionalmente regulamentado para condições de uso, estudos sobre efeito toxicológico vem sendo controverso e insatisfatório em nível celular e sistêmico em poucas pesquisas encontradas na literatura. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil toxicológico *in vitro* e *in vivo* utilizando como modelos experimentais de laboratório invertebrados e vertebrados, realizando uma triagem química do aromatizante sabor de manteiga. Os resultados demonstraram que os constituintes presentes no AM foram butanoato de etila (97,75 %) como constituinte majoritário, 2,3-butanodiona (1,51%), Ácido butanoico (0,39) e hexanoato de etila (0,35%), respectivamente. Foram avaliadas a toxicidade frente a *A. salina* e citotoxicidade frente às células normais humanas de fibroblastos de pulmões por Alamar blue do AM em diferentes concentrações variando de 1 – 25 mg/mL e de 0,4-50 µg/mL, respectivamente. Os resultados demonstraram que o AM de manteiga não possui efeito tóxico contra os náuplios revelando em 24 horas CL<sub>50</sub> de 14,7(13,7-15,7) mg/mL e citotóxico em células de fibroblastos com CI<sub>50</sub> >50 µg/mL. Na investigação da toxicidade aguda, os animais receberam administração via oral por gavagem, dose única do AM, nas doses de 150, 200, 300 e 1000 mg/kg (n = 5 por grupo), além de grupo controle negativo (água destilada, 1 mL/100g) e grupo controle positivo (diazepam 2 mg/Kg, i.p., n = 5) para avaliação nos testes comportamentais observados nos períodos de 1h e 24h e posteriormente até o 14º dia após o tratamento. No entanto, foram observadas mortes em todas as doses testadas, o que permite, de acordo com *Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guideline 423*, estimar que a DL50 do aromatizante seja entre 30 à 300 mg/Kg. Os resultados do *screening* hipocrático mostraram a ausência de mortalidade e a presença de sinais clínicos sugestivos de toxicidade, com alterações comportamentais gerais e motoras. Ainda, foi analisado o efeito do AM no trato gastrointestinal por meio do ensaio de motilidade e observou-se aumento percorrido pelo carvão ativado e consequentemente diminuição do peso relativo com diferenças significativas (p>0,05). O estudo com o aromatizante sabor manteiga revelou constituinte majoritário Butanoato de etila, e *in vitro* ausência de toxicidade frente a *A. salina*, e ausência de citotoxicidade em fibroblastos de pulmões normais, com toxicidade aguda por via oral e alterações comportamentais e fisiológicas no trato gastrointestinal em camundongos *swiss* adultos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ingrediente sintético. CG-MS. Toxicidade.

## ABSTRACT

Flavored butter (AM) is one of the food additives widely used in the food industry for imparting the buttery flavor to food. Despite being nationally and internationally regulated for conditions of use, studies on toxicological effects have been controversial and unsatisfactory at the cellular and systemic level in few the research found in the literature. Therefore, this study aimed to characterize the toxicological profile in vitro and in vivo using as invertebrate and vertebrate laboratory experimental models, performing a chemical sorting of the butter flavor. The results showed that the constituents present in the AM were ethyl butanoate (97.75%) as the major constituent, 2,3-butanedione (1.51%), butanoic acid (0.39) and ethyl hexanoate (0.35 %), respectively. The toxicity to *A. salina* and cytotoxicity against normal human lung fibroblast cells by Alamar blue of the AM at different concentrations ranging from 1 - 25 mg / mL and 0.4 - 50 µg / mL, respectively, were evaluated. The results showed that butter AM does not have a toxic effect against nauplii, revealing a LC50 of 14.7 (13.7-15.7) mg / mL and cytotoxic in IC50 fibroblasts cells > 50 µg / mL in 24 hours. In the acute toxicity investigation, the animals received oral administration by gavage, single dose of AM, at doses of 150, 200, 300 and 1000 mg / kg (n = 5 per group), as well as a negative control group (distilled water, 1 mL / 100 g) and positive control group (diazepam 2 mg / kg, ip, n = 5) for evaluation in the behavioral tests observed in the periods of 1h and 24h and later until the 14th day after treatment. However, deaths were observed at all doses tested, which allows, according to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Guideline 423, to estimate that the LD50 of the flavoring is between 30 and 300 mg / kg. The results of the Hippocratic screening showed the absence of mortality and the presence of clinical signs suggestive of toxicity, with general and motor behavioral alterations. Also, the effect of AM on the gastrointestinal tract was analyzed by means of the motility test and an increase was observed in activated charcoal and consequently a decrease in relative weight with significant differences ( $p > 0.05$ ). The study with flavor butter revealed a constituent majority Butanoate of ethyl, and in vitro absence of toxicity against *A. salina*, and absence of cytotoxicity in fibroblasts of normal lungs, with acute oral toxicity and behavioral and physiological alterations in the gastrointestinal tract in adult swiss mice.

**KEYWORDS:** Synthetic ingredient. CG-MS. Toxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

Os aromatizantes são substâncias que não possuem propriedades nutricionais, mas usados para melhorar o sabor e aroma dos alimentos. Graças à ampla variedade de opções, a indústria de alimentos consegue satisfazer um dos principais requisitos para atrair consumidores que consiste em imitar e melhorar o sabor de alimentos processados com atributo sensorial desejável, bem como aumentar o lucro e a produtividade (MIROKUJI et al., 2014).

Dentre as categorias de aromatizantes permitidos pela legislação para uso em alimentos, naturais e sintéticas, os sintéticos e idênticos ao natural são amplamente utilizados em produtos alimentícios industrializados por apresentarem uma estrutura química semelhante às substâncias presentes nas matérias-primas naturais processadas ou não (BRASIL, 2007; BRASIL 2012). Como podem consistir de um único produto químico ou uma variedade complexa de misturas de compostos, existem diferentes formas físicas: sólidos, líquidos, vapores, ou líquido e vapor encapsulado dentro de um particulado (CURWIN; MCKERNAN, 2015; BRASIL, 2007b; XU et al., 2015).

Internacionalmente, os aromatizantes são regulados por agências de segurança alimentar da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Associação de Fabricantes de Sabor e Extração (FEMA) (XU et al., 2015; MARQUES et al., 2015). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), normatiza o uso de aromatizantes com base no Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes – Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 2, de 15 de janeiro de 2007 (ANVISA, 2007). No entanto, vale ressaltar que dados de segurança, como a Ingestão Diária Aceitável (IDA) não é definida pela legislação para tais substâncias, apenas o uso *quantum satis*, ou seja, a quantidade que julgar suficiente para uso. Mas alguns estudos com aromatizantes mostraram que, quando usados em doses altas, eles causam ação irritante e narcótica, porém não definem quais doses são consideradas altas ou baixas, nem quais os tipos de aromatizantes apresentam toxicidade sistêmica (BRASIL, 2007c; BRASIL, 1999; SALINAS, 2002; POLÔNIO; PERES, 2009).

Apesar de alguns estudos e da regularização para uso e consumo, pouco se sabe sobre os efeitos dos aromatizantes, principalmente, dos

sintéticos, sobre a saúde humana, seja em nível celular ou sistêmico (SHIBAMOTO, 2014). A FEMA e ANVISA consideram urgente e necessária a realização de estudos toxicológicos agudos para avaliar adequadamente a toxicidade dessas substâncias (XU et al., 2015; BRASIL, 2007b,c). Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil toxicológico *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos invertebrados e vertebrados de experimentais de laboratório e realizar a análise química do aromatizante sabor manteiga.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material utilizado**

O aditivo sintético idêntico ao natural “aromatizante sabor manteiga” na forma líquida foi obtido de uma empresa de renome nacional e adquirido no mercado de varejo na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Para a utilização nos testes, o aromatizante encontrava-se com o prazo de validade satisfatório, em embalagem intacta e com características organolépticas (aspecto oleoso, coloração amarelada, odor e sabor de manteiga) dentro dos padrões de qualidade.

### **2.2 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa**

A composição química do aromatizante foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da SHIMADZU, equipado com uma coluna Rxi-5HT, Tamanho: 30 m × 0,25 mm<sup>2</sup>). O gás transportador foi o hélio (1 mL/mL). A temperatura da coluna foi de 40 °C. A taxa de separação foi 10.0 (conferir) e o injetor e interface de temperatura foi 150 °C. O tempo de análise total foi de 49,65 min com um fluxo de 1 mL/min. Os índices de retenção (iR) foram calculados a partir dos tempos de retenção (tR). A quantidade de compostos foi determinada pela integração da área de picos dos espectrogramas. A amostra foi aplicada em triplicata.

### **2.3 Citotoxicidade em células humanas normais**

Células de fibroblastos humanos de pulmão da linhagem MRC-5 foram cultivadas em frascos plásticos para cultura do tipo Corning (25 cm<sup>2</sup>, volume de

50 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em incubadora de células (Shel Lab CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator<sup>®</sup>, Estados Unidos) à 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h.

Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (3 x 10<sup>5</sup> células/poço). Após 24 h, os aromatizantes foram adicionados a cada poço (0,4-50 µg/mL) e as células foram incubadas durante 72 h. Vinte e quatro horas antes do final da incubação, 20 µL de uma solução estoque (0,156 mg/mL) de Alamar Blue<sup>™</sup> foi adicionado a cada poço. A quantificação da proliferação celular foi determinada por espectrofotometria, utilizando um leitor multiplacas (Detector Multimodo DTX 880, Beckman Coulter), a comprimento de onda de 570 e 595 nm para o ensaio Alamar Blue (Ferreira et al., 2015). O grupo controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO (0,1%).

#### **2.4 Toxicidade em *Artemia salina* Leach**

A avaliação da toxicidade em náuplios de *A. salina* foi realizada segundo metodologia descrita por Meyer (1982) e McLaughlin (1991). O teste consiste na exposição dos náuplios na fase II ou III durante 24 e/ou 48 h a concentrações crescentes da amostra que se pretende testar com análise do número de organismos mortos ao final do período de exposição (CETESB, 1987; VEIGA; VITAL, 2002; EL FELS; HAFIDI; OUHDOUCH, 2016). Inicialmente, foram preparados 500 mL de uma solução sintética de sal marinho (30 g/L: NaCl 77,23%, MgSO<sub>4</sub> 9,62%, MgCl 7,13%, CaCl<sub>2</sub> 3,32%, KCl 2,11% e NaHCO<sub>3</sub> 0,59%), à qual foi posteriormente adicionada água mineral não clorada na proporção 1:1 (água marinha artificial) para a incubação dos ovos de *A. salina* (10 mg/L) obtidos comercialmente. Estes foram mantidos a 25 °C, com aeração constante, durante 48 h para favorecer a eclosão das larvas de náuplios. Para o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em tubos de ensaio em um volume total de 5 mL de água marinha artificial com concentrações finais do aromatizante de 1 a 25 mg/mL. O grupo controle negativo foi representado apenas por água. Os



náuplios de fase II (48 h de vida) foram analisados e a contagem do número de larvas mortas foi realizada após 24 h de exposição e expressa como resultados na curva de concentração-efeito (GAD, 2014).

## **2.5 Avaliação Toxicológica Aguda *in vivo* em camundongos**

Para os testes de toxicidade aguda, comportamental e de trânsito intestinal em mamíferos, camundongos *Swiss* fêmeas com 25-30 g de peso e 2 meses de idade foram usadas, todos provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta Purina® *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação ciclo 12 h claro/escuro e acondicionados a uma temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Antes dos estudos, os animais foram aclimatados durante 5 dias no Biotério setorial de Experimentação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e mantidos em jejum por 3-4 h com acesso à água *ad libitum* antes da administração via oral/gavagem. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - Protocolo 256/2016) da Universidade Federal do Piauí (UFPI, Teresina, Piauí).

Levando em consideração a minimização da dor e do sofrimento, bem como a garantia da robustez e reprodutibilidade dos estudos, as propriedades toxicológicas *in vivo* do aromatizante sabor de manteiga foram investigadas de acordo com a toxicidade aguda Classe Tóxica, estabelecida pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organisation for Economic Co-operation and Development - *OECD*), número 423 (*OECD* 423), consistindo em estudo de toxicidade oral aguda, dose única, por um período de 14 dias e respeitando a proporção de 0,1 mL para cada 10 g de peso corpóreo na administração (*OCDE*, 2001; ANVISA, 2013). Os animais foram divididos em 5 grupos ( $n=5/\text{grupo}$ ) e receberam, via oral por gavagem, água destilada (controle negativo) ou doses crescentes de diluições do aromatizante (150, 200, 300 e 1000 mg/kg) (*OCDE*, 2001).

Para o *screening* hipocrático, foram observados detecção de morte e outros sinais de toxicidade aos 30 min, 1 h e 24 h (*OCDE*, 2001; ANVISA,

2013). As propriedades toxicológicas sobre o comportamento geral do animal foram monitoradas a partir dos períodos propostos, nos quais foram avaliados os efeitos sobre: a) Estado de consciência e disposição (frênito vocal e irritabilidade); b) Coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, reflexo de endireitamento); c) Tônus muscular (tônus do corpo, força para agarrar, ataxia); d) Reflexos (corneal); e) Atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômeno de “STRAUB”, hipnose, anestesia); f) Atividade do sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, respiração) (MALONE, 1983; BÉJAR; MALONE, 1993; MAHON et al., 2014). Os animais foram observados diariamente para a anotação de morte e para a geração de um gráfico de Kaplan-Meyer.

### **2.5.1 Avaliação Comportamental**

Para avaliar alterações na exploração, coordenação motora e tônus muscular induzido pelo aromatizante, os animais foram analisados usando os testes de campo aberto, barra giratória (*rota rod*) e labirinto em cruz após 60 min da administração oral de 150, 200, 300 e 1000 mg/kg da amostra teste e controle negativo com água destilada. Um grupo controle positivo recebeu via intraperitoneal Diazepam na dose de 2 mg/kg (n = 5) somente no dia das análises.

#### **2.5.1.1 Campo Aberto**

A avaliação da alteração exploratória por cruzamentos (*crossings*), coordenação motora (*rearing*) e autolimpeza (*grooming*) dos animais foi realizada em uma caixa de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividida em 9 quadrantes iguais. Neste teste foram observados durante o tempo de 5 min: o número de cruzamentos com as quatro patas (*crossings*), comportamento de autolimpeza (*groomings*) e levantamentos (*rearings*) (ARCHER, 1973). Após cada sessão individual do teste, o equipamento foi desinfetado com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

### **2.5.1.2 Rota rod**

Para a avaliação da coordenação e relaxamento muscular, usou-se o teste de barra giratória como conhecido como *rota rod*. Os camundongos foram treinados 24 h antes do experimento para adquirir capacidade de se manter por 180 s em uma haste de 25 mm de diâmetro girando a 17 rpm. Os animais foram colocados com as 4 patas sobre a barra giratória por um período de 3 min, registrando-se, então o número de quedas, com três reconduções, no máximo (CARLINI; BURGOS, 1979). Após cada sessão individual do teste, o equipamento foi desinfetado com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

### **2.5.1.3 Labirinto em cruz elevado**

Para avaliação da ansiedade (observada pelo número e tempo de entradas individualmente nos braços abertos e fechados) e alterações na exploração (pelo número total de entradas) foi realizado o ensaio labirinto em cruz elevado que é fisicamente um aparato feito de madeira e consiste em dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm) cruzados perpendicularmente, no qual o animal é colocado 60 cm acima do solo exatamente na interseção dos braços (plataforma central 5 x 5 cm) com a cabeça voltada para a entrada dos braços fechados. Os animais foram colocados na interseção entre os braços do labirinto 60 min após os tratamentos e observados durante 5 minutos. Os parâmetros quantificados no experimento foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e fechados (NEBF), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e fechados (TPBF) em segundos e o número total de entrada (LISTER, 1987). O teste foi realizado com um animal de cada vez. Após cada sessão individual do teste, o equipamento foi desinfetado com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

## **2.6 Trânsito Intestinal**

Camundongos *Swiss* fêmeas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos (n= 8 animais/grupo): controle negativo (água destilada, via oral por gavagem), controle positivo para aumento do trânsito intestinal (Bisacodil, 10 mg/kg oral), controle positivo para redução do trânsito intestinal (sulfato de

atropina, 5 mg/kg, i.p.) e aromatizante sabor de manteiga (200, 300 e 1000 mg/kg, por gavagem). Assim, 60 min após o tratamento, os animais receberam uma suspensão de carvão ativo 10 % em solução de carboximetilcelulose 1,5 % na proporção de 0,3 mL/animal via oral por gavagem. Trinta minutos depois, os camundongos foram eutanasiados com pentobarbital sódico (150 mg/kg) via intraperitoneal e o intestino delgado foi retirado desde o piloro até o início do ceco. O resultado foi expresso como porcentagem do comprimento total do intestino delgado (MILLER et al., 1981; HARRISON et al., 2004) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Trânsito intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo carvão ativado}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

Em seguida, os intestinos foram pesados para calcular seus respectivos pesos relativos de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Peso relativo (g/100g)}: \frac{\text{Peso do intestino delgado}}{\text{Peso do animal}} \times 100$$

## 2.7 Análises Estatísticas

O valor de CL<sub>50</sub> (concentração inibitória média capaz de provocar 50% de morte) e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) foi calculado a partir de regressão não-linear. Para a análise de sobrevivência, os resultados foram expressos como a média de dias de sobrevivência em um gráfico de Kaplan-Meyer. Para a comparação entre as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer, utilizou-se o teste de *Log-rank* (chi-quadrado). Os dados apresentados como médias ± erro padrão da média (E. P. M.) foram comparados usando análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*) seguidas pelo teste de Student-Newman-Keuls (p<0,05). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA)*.

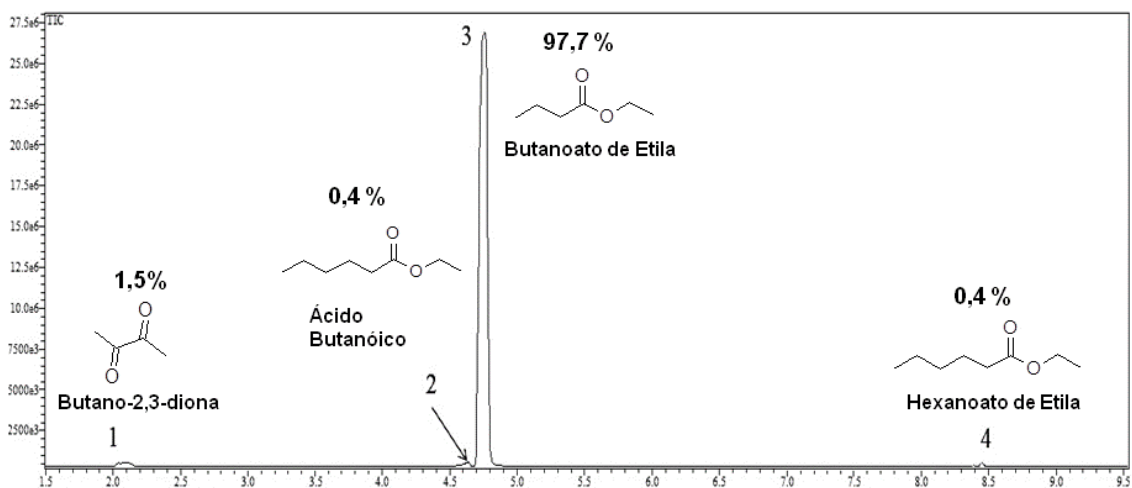
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Perfil Cromatográfico

Inicialmente, foi realizada a identificação dos constituintes majoritários do aromatizante sabor de manteiga, já que existem poucos estudos que detalhem a composição de aromatizantes, devido, principalmente, à dificuldade

de se trabalhar com vários compostos em virtude da mistura complexa usualmente encontrada nesses aditivos (CURWIN; DEDDENS; MCKERNAN, 2015; SALES et al., 2017a). Uma vez autorizados para uso e consumo, mesmo com IDA não especificada, é permitido uso *quantum satis*, ou seja, utilizado em quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico desejado, desde que não alterem a identidade e a genuinidade do alimento (ANVISA, 2007). Obviamente, quantificar a composição química dos aditivos deveria ser o primeiro passo para adequadamente ajustar a IDA e a toxicidade alimentar de produtos industrializados que possuem aditivos em sua composição.

As análises revelaram que o composto butanoato de etila representa 97,75 % do aromatizante, seguido pelos demais constituintes em quantidades menores 2,3-butanodiona (1,5%), ácido butanoico (0,4 %) e hexanoato de etila (0,4 %). A correlação dos picos cromatográficos foi obtida pela comparação dos tempos de retenção (tR) com padrões de referência. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata e revelaram os respectivos tempos de retenção (tR): 4,76, 2,04, 4,64 e 8,47 min.



**Figura 1** - Perfil cromatográfico do aromatizante sabor de manteiga por realizado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) e determinado com luz UV em comprimento de onda de 230 nm.

Curiosamente, o butanoato de etila é aqui mostrado como o constituinte majoritário, contrastando, portanto, com a maioria dos estudos que descrevem o composto diacetil (2,3-Butanodiona) como o constituinte predominante dentre 100 produtos químicos encontrados no aromatizante de manteiga e um dos

mais importantes para conferir aroma e sabor amanteigado aos alimentos (BOYLSTEIN et al., 2006; MARTYNY et al., 2008; WHITE et al., 2010). Por outro lado, o 2,3-butanodiona vem sendo recentemente utilizado não apenas como um constituinte, mas como o próprio microingrediente aromatizante (BRASS; PALMER, 2017), embora seja mais comum os aromatizantes, em geral, serem misturados a outros aditivos diluentes, conservantes e corantes (BRASIL, 1999; XU et al., 2015). As incertezas da composição dos aditivos aromatizantes corroboram a ausência de estudos detalhados, mesmo sendo eles muito encontrados em alimentos processados e livremente comercializados em mercados de venda especializados em aditivos alimentares.

### **3.2 Toxicidade em Animais de Laboratório**

Vários métodos aplicados em toxicologia são úteis para prever a toxicidade em geral, como células animais, células vegetais, microalgas, animais invertebrados e mamíferos (FERREIRA et al., 2009; ANVISA, 2013; CARVALHO et al., 2016; OKONKWO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; SALES et al., 2017a,b). Os testes de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta e direta sobre o risco que uma determinada amostra apresenta para a população humana, uma vez que é muito difícil extrapolar para os seres humanos os resultados de toxicidade obtidos para os organismos em laboratório e até mesmo correlacionar os resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies. Porém, a análise de parâmetros de toxicidade como ocorrência, natureza, incidência, mecanismo e fatores de risco associados às substâncias tóxicas servem não somente para proteger os seres vivos e o ambiente dos efeitos deletérios causados pelas substâncias tóxicas, mas também facilita o desenvolvimento de agentes químicos mais seletivos, tais como nutracêuticos e fármacos (COSTA et al., 2008).

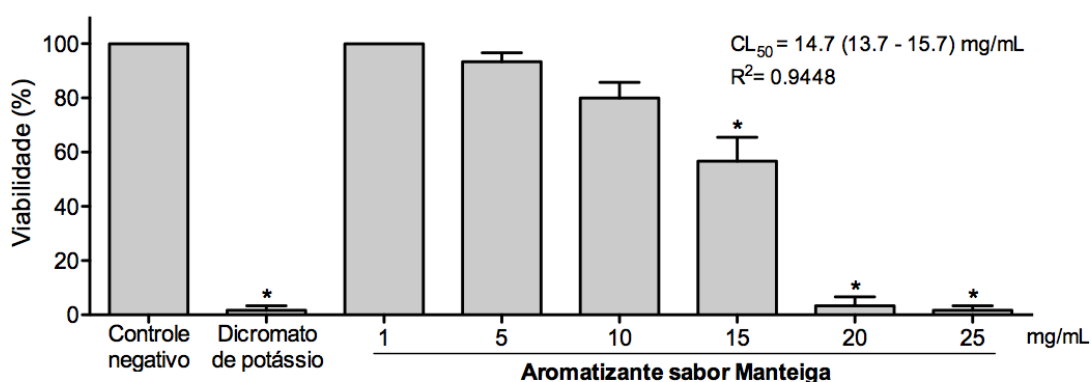
#### **3.2.1 Toxicidade em náuplios de *Artemia salina***

Embora a toxicologia continue dependendo fortemente do uso de mamíferos para a previsão do risco de toxicidade de substâncias exógenas em seres humanos (HOUCK; KAVLOCK, 2008; ROBERTES et al., 2015; SALES et al., 2017c), há uma tendência mundial para o desenvolvimento de métodos

alternativos ao uso de animais como preditivos de toxicidade (CAZARIN et al., 2004). Com esse intuito, avaliou-se, inicialmente, a toxicidade aguda do aromatizante sabor de manteiga em náuplios de *Artemia salina*.

Os organismos do gênero *Artemia* atuam como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores, o que explica seu uso como biossensor ecotoxicológico. Por se tratar de um animal de fácil manutenção em condições de laboratório, sensível e de baixo custo, ele tem sido largamente utilizado pela comunidade científica, pois permite uma avaliação preliminar da toxicidade de produtos naturais e sintéticos, além de possibilitar a determinação de valores de  $CL_{50}$ .

A avaliação da toxicidade sobre *A. salina* após 24 h de exposição revelou um valor de  $CL_{50}$  de 14,7 (13,7-15,7) mg/mL e correlação linear de forma concentração dependente ( $R^2 = 0,9448$ ) (**Figura 2**). O controle positivo dicromato de potássio causou 100% de mortalidade. Dessa forma, de acordo Meyer et al., (1982), o aromatizante sabor manteiga é considerado não tóxico para náuplios de *A. salina*, uma vez que, a  $CL_{50}$  foi superior a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , embora observado mortes em concentrações acima de 15,000  $\mu\text{g/mL}$  quando comparados com o grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2** - Viabilidade do microcrustáceo *Artemia salina* L. ( $CL_{50}$ ) após 24 h de exposição ao aromatizante sabor de manteiga. O controle positivo recebeu dicromato de potássio (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Os valores são expressos em média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de *Newman-Keuls test*.

Os estudos de determinação da  $CL_{50}$  em *A. salina* mostram forte correlação com valores encontrados em camundongos, sugerindo que este

bioensaio proporciona vantagens na avaliação de toxicidade, pois infere informações úteis no prosseguimento de estudos toxicológicos mais avançados, então podendo ser utilizado como ensaio preliminar de químicos tóxicos para determinar a janela de ação tóxica em mamíferos (ARCANJO et al., 2012; ISLAM et al., 2016) e reduzir o número e o sofrimento (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Embora não haja estudos especificamente com aromatizantes de sabor manteiga que tenha definição de  $CL_{50}$ , estudos realizados com os corantes alimentares carmoisina (vermelho para alimentos), aspartame, adoçante sintético 200 vezes mais potente que a sacarose, o azul brilhante e amarelo pôr-do-sol revelaram valores de  $CL_{50}$  de 40,1, 68,8, 70,1 e 81  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, todos considerados muito tóxicos e valores de  $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  (DAVID et al., 2001; NGUTA et al., 2011). Já pesquisas com conservantes como o ácido cítrico, ácido benzóico e o fosfato de sódio apresentaram efeitos citotóxicos após 24 h e/ou 48 h de exposição. Além disso, a avaliação citológica dos náuplios revelou parada de crescimento e da diferenciação celular na zona abdominal com todos os excipientes testados e dano significativo à membrana e vacuolização celular na maior concentração do ácido cítrico (SCHRODER; BUCUR; PAVALACHE, 2014; SAATLOO et al., 2015). A ausência de toxicidade em náuplios foi corroborada pela ausência de citotoxicidade em fibroblastos humanos MRC-5, fato explicado, pelo menos parcialmente, pela correlação entre citotoxicidade em células e toxicidade em náuplios (MEYER et al., 1982; ISLAM et al., 2016).

### **3.2.2 Toxicidade Aguda em Camundongos**

Avaliações preliminares de toxicidade são necessárias para dar suporte a ensaios clínicos racionais. Assim, testes pré-clínicos *in vivo* com substâncias bioativas, diluentes, estabilizantes, lubrificantes, nutracêuticos e xenobióticos são, em geral, realizados para caracterizar potenciais efeitos adversos e para fornecer estimativas iniciais de margens de segurança. Desta forma, pode ser determinado se um composto ou uma mistura de um ou mais componentes ativos ou inativos pode ser seguro para humanos (GREAVES et al., 2004; ANSEL; ALLEN; POPOVICH, 2013; FERREIRA et al., 2014). No caso desses testes apresentarem resultados indesejáveis, tais substâncias consideradas tóxicas são provavelmente eliminadas de estudos futuros.



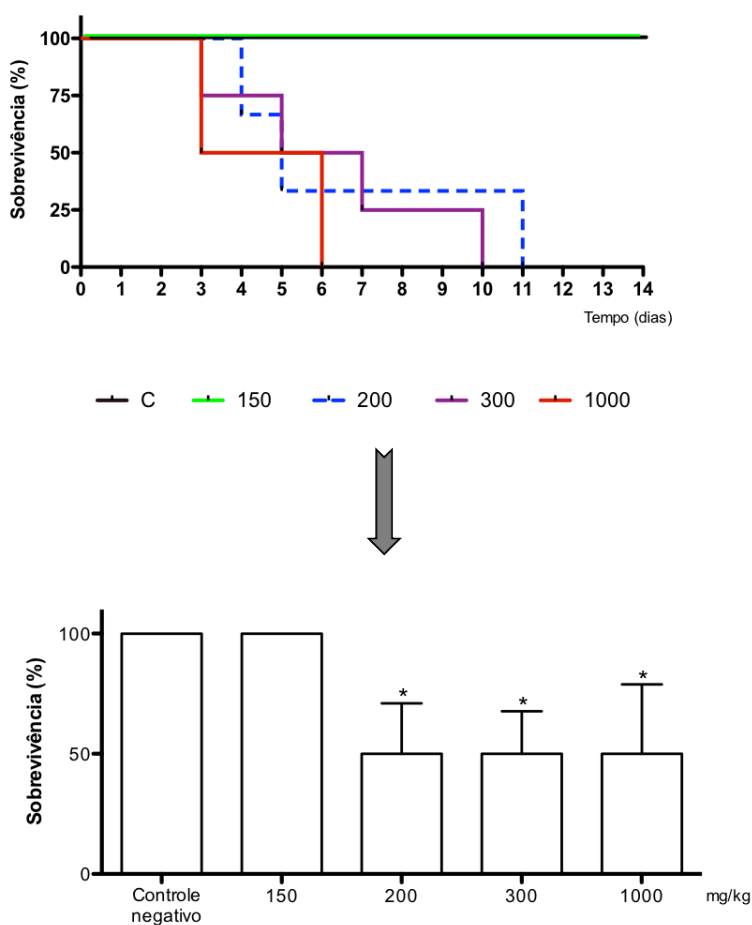
No *screening* hipocrático foram constatados sinais de toxicidade em alguns dos parâmetros analisados após 1 h e 24 h (**Tabela 1**). Dentre os sinais clínicos, os mais evidentes foram: aumento da defecação, da ptose palpebral, da atividade geral e diminuição na força de agarrar. Porém, nenhuma morte foi detectada até 24 h pós-tratamento.

**Tabela 1** – Efeitos tóxicos agudos do aromatizante sabor manteiga após a administração oral por gavagem em camundongos adultos *Swiss*.

Grupo	Dose (mg/kg)	Sinais de toxicidade	
		1h	24h
Controle Negativo	Água destilada	-	-
	150	Defecação aumentada.	Atividade geral diminuída.
	200	-	Atividade geral e força de agarrar diminuídas e ptose palpebral.
	300	Força de agarrar e defecação aumentada.	Atividade geral e força de agarrar diminuída, presença de ptose palpebral e defecação aumentada.
Aromatizante de sabor Manteiga	1000	Atividade geral diminuída e defecação aumentada.	Atividade geral e força de agarrar diminuída, presença de ptose palpebral e defecação aumentada.

Para análise do padrão de sobrevivência, utilizou-se a técnica apresentada pelo método de Kaplan-Meier. Esse método considera a sobrevida, uma variável que relaciona tempo e evento ao medir o tempo entre o início da observação até a ocorrência de um evento. Nesse caso o evento é a morte (BUSTAMANTE-TEIXEIRA; FAERSTEIN; LATORRE, 2002; FERREIRA; PATINO, 2016). Para facilitar o entendimento, os resultados também foram expressos em gráfico de barras (**Figura 3**). O surgimento de mortes foi influenciado pela dose e pelo tempo após administração. Nenhuma morte foi detectada na menor dose (150 mg/kg); 3 mortes ocorreram na dose de 200 mg/kg (4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dia); 4 mortes na dose de 300 mg/kg (3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia) e

2 mortes na dose de 1000 mg/kg (3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dia), o que gerou um média de sobrevida de 5, 6 e 4,5 dias para as doses de 200, 300 e 1000 mg/kg, respectivamente, sem diferença estatística entre os grupos tratados ( $p > 0,05$ ) mas com nítida redução do tempo de vida quando tais grupos foram comparados com o controle negativo (14 dias) ( $p < 0,05$ ). Como visto anteriormente, as mortes iniciaram mais tardiamente a partir do 3<sup>o</sup> dia.



**Figura 3** - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos *Swiss* tratados com dosagem única do aromatizante sabor manteiga via oral por gavagem. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (água destilada). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo por *Log-rank* (chi-quadrado).

De acordo com o Guia OECD usado para classificar as substâncias em cinco categorias de toxicidade com base em sistemas internacionalmente aceitos (*Globally Harmonised System* - GHS), é possível inferir que o

aromatizante sabor manteiga enquadra-se na Categoria 3 de periculosidade com valor de DL<sub>50</sub> entre 50-300 mg/kg (OECD, 2001).

Estudos anteriores com o composto 2,3-pentadiona, um dos componentes de aromatizantes sabor manteiga, apresentaram taxas variáveis de sobrevivência em dois experimentos independentes, mas não mostraram diferenças quanto ao sexo, fato pelo qual escolhemos trabalhar com apenas um sexo para reduzir o número de animais usados. Nesse estudo de Morgan et al. (2012), a inalação de até 200 ppm do composto 2,3-pentadiona pelas vias aéreas por até 5 dias/semana durante 6 h/dia reduziu a sobrevivência de ratos e camundongos, a qual variou de 67 a 100 %. Ainda, esses pesquisadores sugerem que a morte tenha sido causada pela indução de um processo inflamatório agudo alveolar semelhante à bronquiolite obliterante.

Recentemente, a avaliação de parâmetros toxicogenéticos por meio do teste de *Allium cepa*, um bioensaio reconhecido pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) da Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007), após tratamento de 24h e/ou 48 h com aromatizantes de uva, ameixa e de laranja, revelou alterações no fuso mitótico e aumento de micronúcleos, C-metáfases, pontes anafásicas e telofásicas e células binucleadas em raízes em crescimento, elevando, significativamente, o número total de aberrações cromossômicas. Enquanto isso, os animais tratados com esses aromatizantes apresentaram inchaço abdominal (principalmente na maior dose) e a maioria morreu antes do 7º dia após doses diárias de 2, 5 e 10 mg/kg via oral por gavagem. Além disso, eles apresentaram mielotoxicidade, com redução da formação de eritrócitos policromáticos. Alterações celulares semelhantes e redução expressiva da divisão celular de tecidos meristemáticos de raízes também foram encontradas após tratamento associado com aromatizantes dos sabores biscoito, tutti-fruti, morango, chocolate, leite condensado e maracujá (MARQUES et al., 2015; SALES et al., 2017a,b,c).

### **3.2.3 Alterações Comportamentais Agudas**

Primeiramente, analisou-se o número de quedas e o tempo de permanência na barra giratória (**Tabela 1**). O teste de *rota rod* foi utilizado para mensurar a coordenação motora e modificações no tônus muscular dos

animais após o tratamento em função da sua permanência em uma barra giratória (CARLINI; BURGOS, 1979; ARAÚJO et al., 2017). Com exceção da menor dose, as outras maiores (200, 300 e 1,000 mg/kg) aumentaram significativamente o número de quedas e, assim, reduziram o tempo de permanência na barra giratória ( $3,0 \pm 0,0$ ,  $2,8 \pm 0,2$  e  $2,8 \pm 0,2$  quedas;  $52,8 \pm 5,4$ ,  $44,4 \pm 6,8$  e  $48,2 \pm 15,0$  s), quando comparados com o controle negativo ( $1,0 \pm 0,5$  e  $162,8 \pm 14,3$  s, respectivamente) ( $p < 0,05$ ). Resultados semelhantes foram encontrados com o controle positivo diazepam, o qual aumentou o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra giratória ( $p < 0,05$ ).

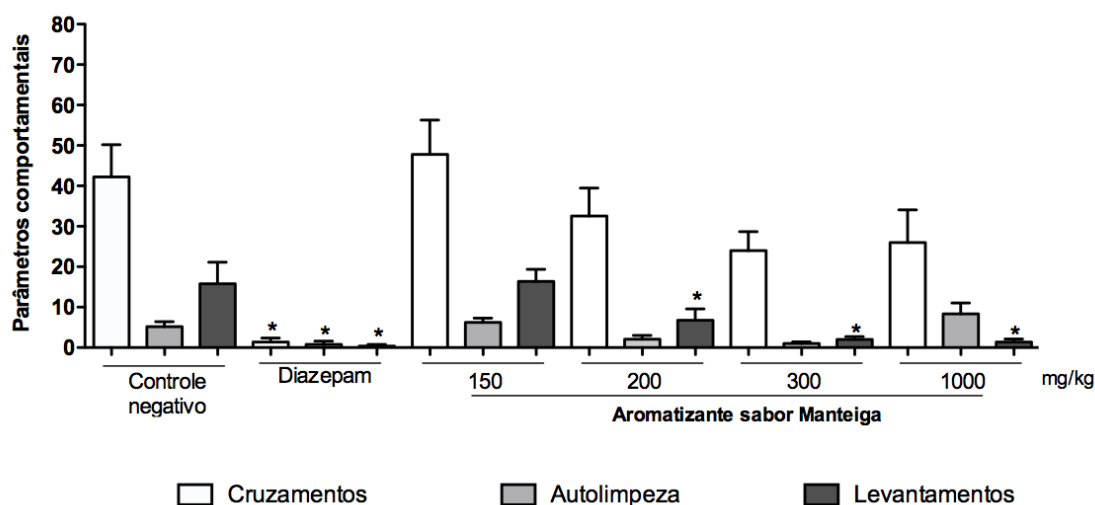
**Tabela 2** - Efeitos do aromatizante sabor manteiga sobre a coordenação motora de camundongos *Swiss* após a administração única via oral por gavagem avaliados pelo teste *rota rod*.

Amostras	Doses (mg/kg)	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
Controle negativo	Água destilada	$1,0 \pm 0,5$	$162,8 \pm 14,3$
Diazepam	2	$3,0 \pm 0,0^*$	$71,0 \pm 3,8^*$
	150	$0,4 \pm 0,3$	$174,0 \pm 4,0$
Aromatizante sabor Manteiga	200	$3,0 \pm 0,0^*$	$52,8 \pm 5,0^*$
	300	$2,8 \pm 0,2^*$	$44,4 \pm 6,8^*$
	1000	$2,8 \pm 0,2^*$	$48,2 \pm 15,0^*$

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5$  animais/grupo). Diazepam (2 mg/kg) foi usado como controle positivo.  $*p < 0,05$  quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de *Newman-Keuls test*.

Em seguida, realizou-se o teste do campo aberto, muito utilizado para verificar ansiedade nos animais em função do número de quadrantes percorridos e da quantidade de *rearings* (comportamento exploratório) e *groomings* (imobilidade ao executar autolimpeza) (ARCHER, 1973; NEUMANN et al., 2011). Dentre os parâmetros analisados, os levantamentos (*rearings*) sofreram mudanças significativas, uma vez que ocorreu redução dos levantamentos ( $5,4 \pm 2,6$ ,  $2,0 \pm 0,7$  e  $1,4 \pm 0,7$ ) após a administração de 200, 300 e 1000 mg/kg do aromatizante quando comparados ao controle negativo ( $15,8 \pm 5,3$ ;  $p < 0,05$ ) (**Figura 4**). Resultados semelhantes foram encontrados

com o controle positivo diazepam, o qual também reduziu o comportamento exploratório ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4** - Efeitos do aromatizante sabor manteiga sobre o número de cruzamentos, autolimpeza e levantamentos após a administração única via oral por gavagem em camundongos *Swiss*. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5$  animais/grupo). Diazepam (2 mg/kg) foi usado como controle positivo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de *Newman-Keuls test*.

Por último, realizou-se o teste de labirinto em cruz elevado, baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos tendo como premissa básica o fato que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva (MONTGOMERY, 1955; RODGERS et al., 1997). Dos parâmetros analisados nos grupos-teste, apenas o aumento do número total de entradas (número de entradas no aberto + número de entradas no braço fechado:  $14,6 \pm 2,7$ ) foi constatado nos animais tratados com 1000 mg/kg de aromatizante sabor manteiga ( $p < 0,05$ , **Tabela 3**). Enquanto isso, o diazepam aumentou o NEBA ( $10,3 \pm 0,5$ ), o TPBA ( $143,3 \pm 39,0$ ) e o número total de entradas ( $14,0 \pm 0,9$ ) quando comparado ao controle negativo ( $5,4 \pm 1,1$ ,  $30,8 \pm 9,0$  e  $7,8 \pm 1,4$ ,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Efeitos do aromatizante sabor manteiga sobre o comportamento exploratório de camundongos *Swiss* após a administração única via oral por gavagem avaliados pelo teste labirinto em cruz elevada.

Amostras	Doses (mg/kg)	NEBA	NEBF	TPBA	TPBF	Número total de entradas
Controle negative	Água destila	5,4 ± 1,1	6,0 ± 0,7	30,8 ± 9,0	187,8 ± 27,8	7,8 ± 1,4
Diazepam	2	10,5 ± 0,5*	4,2 ± 0,6	143,3 ± 39,0*	226,2 ± 18,9	14,0 ± 0,9*
	150	4,8 ± 1,1	3,8 ± 0,9	88,5 ± 21,7	141,4 ± 21,5	10,3 ± 42,3
Aromatizante de sabor	200	1,4 ± 0,7	5,0 ± 0,9	29,5 ± 6,5	212,8 ± 27,8	6,4 ± 1,2
Manteiga (%)	300	4,0 ± 1,6	4,2 ± 0,4	58,8 ± 21,6	176,6 ± 33,3	7,4 ± 1,6
	1000	6,4 ± 1,6	8,2 ± 1,2	38,8 ± 11,3	171,4 ± 19,9	14,6 ± 2,7*

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n= 5 animais/grupo). Diazepam (2 mg/kg) foi usado como controle positivo. \*p<0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de *Newman-Keuls test*. NEBA – Número de entrada nos braços abertos, NEBF – Número de entrada nos braços fechados, TPBA – Tempo de permanência nos braços abertos e TPBF- Tempo de permanência nos braços fechados.

Sabe-se que os roedores de laboratório apresentam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos e numa chance de escolha como em um labirinto em Y, preferem consistentemente os braços fechados e que o número de entradas pode ser considerado como índice de atividade locomotora. Logo, ansiolíticos como o fármaco diazepam aumentam a proporção de entradas nos braços abertos e o total de entradas, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuem tais parâmetros fisiológicos (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987).

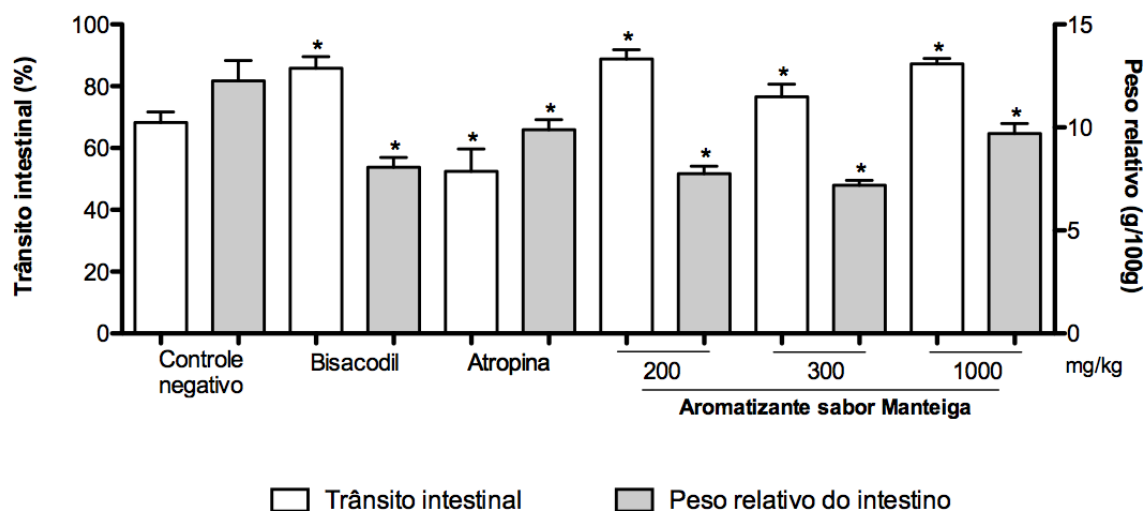
Assim, os sinais comportamentais agudos mais comumente associados animais tratados com o aromatizante de manteiga foram relaxamento muscular e aumento da atividade locomotora (pelo aumento do número de cruzamentos) por redução do tônus/equilíbrio na barra giratória com consequente aumento no número de quedas e aumento do número total de entradas nos braços aberto e fechados, principalmente nas maiores doses, sugerindo ações sedativas e/ou hipnóticas. Esses dados comportamentais confirmam a redução da atividade geral, da coordenação do sistema motor (força de agarrar) e da tonificação muscular (ptose palpebral) na triagem hipocrática (MALONE; ROBICHAUD, 1962; NOGUEIRA-NETO et al., 2012; TRAESEL et al., 2014). Dessa forma, tais evidências sugestivas da forma como o aromatizante sabor manteiga altera o estado emocional de animais podem ser o resultado de modificações neuroquímicas ou de lesões no sistema nervoso central havendo, portanto, a possibilidade de associar modificações comportamentais com exposições neurotóxicas aos aditivos alimentares (McCANN et al., 2007; VIAUD-DELMON et al., 2011; FDA, 2011; ARAÚJO et al., 2017).

Do ponto de vista clínico, alguns estudos mostram que os aromatizantes, em nível sistêmico, podem ser bastante tóxicos quando usados por períodos prolongados, promovendo a hiperatividade em crianças com ou sem déficit de atenção (STEVENS et al., 2014). De fato, há mais de 40 anos já se relacionava o surgimento de “crianças imperativas” com o consumo de aromas artificiais, corantes e conservantes, os quais eram considerados como a causa primária para esse tipo de transtorno (FEINGOLD, 1975).

### 3.3 Trânsito intestinal

Uma vez que alguns animais tratados com o aromatizante sabor manteiga nas maiores doses (300 e 1000 mg/kg) apresentaram um aumento na ocorrência de defecações embora não tenha sido detectada significativa perda de peso, decidiu-se avaliar se o aromatizante altera o trânsito intestinal e, assim, se interferir na absorção de nutrientes e fármacos. Para tanto, utilizou-se o teste de motilidade intestinal, um ensaio usado para avaliação de substâncias com ação moduladora sobre o trato gastrointestinal (MITTELSTADT; HEMENWAY; SPRUELL, 2005; RODRIGUES et al., 2014).

O aromatizante aumentou a distância percorrida pelo carvão ativado ( $88,8 \pm 2,9$ ,  $80,5 \pm 4,3$  e  $87,2 \pm 1,7$  %) assim como o Bisacodil ( $87,7 \pm 3,7$  %) quando comparado ao controle negativo ( $66,9 \pm 3,6$  %) nas doses de 200, 300 e 1000 mg/kg, respectivamente. Por outro lado, a atropina diminuiu o trânsito intestinal ( $49,3 \pm 7,4$  %) ( $p < 0,05$ , **Figura 5**). Esses dados confirmam o aumento da ocorrência de defecações em todas as doses testadas e em ambos os tempos avaliados (1 e 24 h) no *screening* hipocrático.



**Figura 5** - Avaliação do trânsito intestinal e do peso relativo do intestinal delgado de camundongos adultos *Swiss* tratados com o aromatizante sabor manteiga com dose única via oral por gavagem. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (água destilada). Como controles positivos, foram usados Bisacodil 10 mg/kg oral e Atropina 5 mg/kg, i.p. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. ( $n=8$ /grupo). \* $p>0,05$  comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls.



Muitos compostos químicos atualmente em uso na clínica e alimentos industrializados alteram a fisiologia do trato gastrointestinal, seja por ação antiproliferativa inespecífica sobre os enterócitos do intestino delgado em constante renovação, ação irritativa da mucosa, inibição de transportadores tipo ABC (*ATP-binding cassette*) presentes nas membranas dos enterócitos, ação genotóxica em órgãos mesmo em baixas doses (10 mg/kg) e/ou interação direta no metabolismo e absorção de componentes do alimento, o que leva à perda de peso, de nutrientes, vômitos, constipação e/ou diarreia (SASAKI et al., 2002; STEIN et al., 2010; JALILZADEH-AMIN; MAHAM, 2013; SJÖSTEDT et al., 2017). Apesar disso, a própria ANVISA afirma que aromatizantes produzem toxicidade no trato digestivo somente após ingestão crônica, e se usados indiscriminadamente (BRASIL, 2007c). Entretanto, os resultados obtidos aqui contrariam tal indicação da ANVISA, uma vez que foi observada nítidos sinais sugestivos de toxicidade aguda sobre o TGI após ingestão única em baixas doses.

#### **4 CONCLUSÃO**

O presente estudo revelou, pela primeira vez, o composto butanoato de etila como majoritário do aromatizante sabor manteiga. Tal aromatizante não apresentou efeitos de toxicidade contra náuplios de *Artemia salina* uma vez que a  $CL_{50}$  foi superior a 1000 µg/mL e nem citotoxicidade em fibroblastos de pulmão humano. No entanto, foi classificado como categoria 3 de toxicidade aguda uma vez que causou alterações comportamentais agudas em camundongos, incluindo perda de coordenação motora, relaxamento muscular, aumento da atividade locomotora, das defecações, do trânsito intestinal e indução de diarreia.

É interessante destacar que nenhuma investigação anterior avaliou a segurança desse aromatizante em modelos animais ou nos modelos *in vitro* aqui utilizados. Assim, ao estimar a  $DL_{50}$  e determinar a toxicidade sistêmica, criou-se condições essenciais para o desenvolvimento de novos trabalhos sobre as propriedades toxicológicas e antinutricionais dos aromatizantes.

## REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; ALLEN, L.; POPOVICH, N. G. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARAÚJO, E. J. F.; DE ALMEIDA, A. A. C.; SILVA, O. A.; DA COSTA, I. H. F.; REZENDE-JÚNIOR, L. M.; LIMA, F. C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; FERREIRA, P. M. P. Behavioral effects induced by antitumor clonidine diterpenes from *Casearia sylvestris* and in silico interactions with neuron receptors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 460-467, 2017.

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Aditivo Aromatizante**. RDC Nº 2 de 15 de Janeiro de 2007a. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Anexo%2BRDC%2B2.pdf/84947fce-1b8f-4a2c-978e-2e23cf67f1>>. Acesso em: 17 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boas práticas no uso de aditivos alimentares**. Resolução N. 05. Poços de Caldas, MG, 2007b. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf)>. Acesso em: 17 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 05, de 15 de Janeiro de 2007**. (2007c). Disponível em: <

[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf)>. Acesso em: 20 de outubro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico Nº 52/2012 GPESP/GGALI/ANVISA, 28 de novembro de 2012.** (2012). Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+52%2C+de+28+de+novembro+de+2012/8e1e812b-9ed6-4fc0-bd11-186c3c9f7bdf>>. Acesso em: 19 de outubro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 1999 [visto em 13 de abril de 2015]. *Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999. **Aprova o Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes / aroma.*** Diário Oficial da República Federativa do Brasil [online], Brasília.

Disponível

em: <[http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual\\_aditivos\\_aromatizantes.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual_aditivos_aromatizantes.htm) >. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

BRASS, D. M.; PALMER, S. M. Models of toxicity of diacetyl and alternative diones. **Toxicology**, v. 388, p. 15–20, 2017.

BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; FAERSTEIN, F.; LATORRE, M. R. Técnicas de análise de sobrevida. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 579-594, 2002.

BOYLSTEIN, R.; PIACITELLI, C.; GROTE, A.; KANWAL, R.; KULLMAN, G.; KREISS, K. Diacetyl emissions and airborne dust from butter flavorings used in microwave popcorn production. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 3, n. 10, p. 530–535, 2006.

CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Água do Mar: teste de toxicidade aguda com Artemia. São Paulo, SP. L05.021, 1987.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorbenzepam. **Revista de Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, n. 1, p. 25-31, 1979.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, 2004.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CURWIN, B. D.; DEDDENS, J. A.; MCKERNAN, L. T. Flavoring exposure in food manufacturing. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 25, n. 3, p. 324–333, 2015.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignanais e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

EL FELS, L.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y. Artemia salina as a new index for assessment of acute cytotoxicity during co-composting of sewage sludge and lignocellulose waste. **Waste Management**, v. 50, p. 194-200, 2016.

FDA (Food and Drug Administration, Food Advisory Committee - FAC). Overview and Evaluation of Proposed Association between Artificial Food Colors and Attention Deficit Hyperactivity Disorders (ADHD) and Problem Behaviors in Children. **Interim Toxicology Review Memorandum**, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/FoodAdvisoryCommittee/UCM248113.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2017.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, M. A. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 207-216, 2009.

FERREIRA, P. M. P.; ARAUJO, E. J. F.; SILVA, J. N.; FREITAS, R. M.; COSTA, N. D. J.; OLIVEIRA, S. F. C.; PEREIRA, J. B. A.; PINHEIRO, J. A. F.; ABREU, M. C.; PESSOA, C. **Safety and efficacy of *Moringa oleifera* Lamarck (1785) - Therapeutic and toxicological properties**. In: Sivakumar Joghi Thatha Gowder. (Org.). *Pharmacology and Therapeutics*. 1ed., 2014, v. 1, p. 177-204.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J. B.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R. M.; FILHO, G. B. O.; FERREIRA, J. M.; QUEIROZ, M. G. R.; LEITE, A. C. L.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais de Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 313-330, 2015.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. 2-3. O que é análise de sobrevivência e quando devo utilizá-la? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 1, p. 77-77, 2016.

FEDAN, J. S.; DOWDY, J. A.; FEDAN, K. B.; HUBBS, A. F. Popcorn worker's lung: in vitro exposure to diacetyl an ingredient in microwave popcorn butter flavoring, increases reactivity to methacholine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 215, n. 1, p. 17-22, 2006.

FEINGOLD, B. F. **Why your child is hyperactive**. New York: Random House, 1975.

FENNELL, T. R.; MORGAN, D. L.; WATSON, S. L.; DHUNGANA, S.; WAIDYANATHA, S. Systemic uptake, albumin and hemoglobin binding of

[(14)C]2,3-butanedione administered by intratracheal instillation in male Harlan Sprague Dawley rats and oropharyngeal aspiration in male B6C3F1/N mice.

**Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 112-119, 2015.

GAD, S. C. "LD50/LC50 (Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50)".

**Encyclopedia of Toxicology**, p. 58–60, 2014.

GREAVES, P.; WILLIAMS, A.; EVE, M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 3, n. 3, p. 226-236, 2004.

HARRISON, A. P.; ERLWANGER, K. H.; ELBRØND, V. S.; ANDERSEN, N. K.; UNMACK, M. A. Gastrointestinal-tract models and techniques for use in safety pharmacology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, n. 3, p. 187-199, 2004.

HOUCK, K. A.; KAVLOCK, R. J. Understanding mechanisms of toxicity: Insights from drug discovery research. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 277, n. 2, p. 163-178, 2008.

HUBBS, A. F.; BATTELLI, L. A.; GOLDSMITH, W. T.; PORTER, D. W.; FRAZER, D.; FRIEND, S.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MERCER, R. R.; REYNOLDS, J. S.; GROTE, A.; CASTRANOVA, V.; KULLMAN, G.; FEDAN, J. S.; DOWDY, J.; JONES, W. G. Necrosis of nasal and airway epithelium in rats inhaling vapors of artificial butter flavoring? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 185, n. 2, p. 128-135, 2002.

HUBBS, A. F.; CUMPSTON, A. M.; GOLDSMITH, W. T.; BATTELLI, L. A.; KASHON, M. L.; JACKSON, M. C.; FRAZER, D. G.; FEDAN, J. S.; GORAVANAHALLY, M. P.; CASTRANOVA, V.; KREISS, K.; WILLARD, P. A.; FRIEND, S.; SCHWEGLER-BERRY, D.; FLUHARTY, K. L.; SRIRAM, K. Respiratory and olfactory cytotoxicity of inhaled 2,3-pentanedione in Sprague-Dawley rats? **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 3, p. 829-844, 2012.

ISLAM, T.; SANTOS, J. V. O.; FERREIRA, J. R. O.; SOUSA, J. M. C.; PAZ, M. F. C. J.; CARVALHO, R. M.; MATA, A. M. O. F.; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, R. M. T.; SILVA, M. B. S.; ALENCAR, M. V. O. B.; FERREIRA, P. M. P.; DANTAS, S. M. M. M.; CAVALCANTE, A. A. C. M. A possible phytol-cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway. **International Archives of Medicine**, v. 9, n. 188, p. 1-11, 2016.

JALILZADEH-AMIN, G.; MAHAM, M. The application of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in medicinal plants, inhibits castor oil-induced diarrhea in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 4, p. 594–599, 2015.

KELLY, F. L.; SUN, J.; FISCHER, B. M.; VOYNOW, J. A.; KUMMARAPURUGU, A.B.; ZHANG, H. L.; NUGENT, J. L.; BEASLEY, R. F.; MARTINU, T.; GWINN, W. M.; MORGAN, D. L.; PALMER, S. M. Diacetyl induces amphiregulin shedding in pulmonary epithelial cells and in experimental

bronchiolitis obliterans? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular biology**, v. 51, n. 4, p. 568-574, 2014.

KREISS, K.; GOMAA, A.; KULLMAN, G.; FEDAN, K.; SIMOES, E. J.; ENRIGHT, P. L. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant? **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 330-338, 2002.

KOCA, N.; ERBAY, Z.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Effects of spray-drying conditions on the chemical, physical and sensory properties of cheese powder. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 934-43, 2015.

LISTER, R. G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A. Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Llordya**, v. 25, n. 4, p. 320-331, 1962.

MARTYNY, J. W.; VAN DYKE, M. V.; ARBUCKLE, S.; TOWLE, M.; ROSE, C. S. Diacetyl exposures in the flavor manufacturing industry. **Journal Of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 5, n. 11, p. 679-688, 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 Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 183-188, 2015.

MAHON, C. P. C. A. N.; COLODEL, E. M.; BALOGUN, S. O.; OLIVEIRA, R. G.; MARTINS, D. T. O. Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 665-671, 2014.

McCANN, D.; BARRETT, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L.; GRIMSHAW, K.; KITCHIN, E.; LOK, K.; PORTEOUS, L.; PRINCE, E.; SONUGA\_BARKE, E.; WARNER, J. O.; STEVENSON, J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 3; n. 370, p. 1560-1567, 2007.

MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: DEY, P.; HARBORNE, J.; HOSTETTMANN, K. (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. 6ª edição. London: Academic Press, 1991. p. 1-32.

MEYER, B.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; Mc LAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MILLER, M. S.; GALLIGAN, J. J.; BURKS, T. F. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 6, n. 3, p. 211–217, 1981.

MILLER, A. G.; GERRARD, J. A. Assessment of protein function following cross-linking by alpha-dicarbonyls. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 195-200, 2005.

MIROKUJI, Y.; ABE, H.; OKAMURA, H.; SAITO, K.; SEKIYA, F.; HAYASHI, S.; MARUYAMA, S.; ONO, A.; NAKAJIMA, M.; DEGAWA, M.; OZAWA, S.; SHIBUTANI, M.; MAITANI, T. The JFFMA assessment of flavoring substances structurally related to menthol and uniquely used in Japan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 314–321, 2014.

MITTELSTADT, S. W.; HEMENWAY, C. L.; SPRUELL, R. D. Effects of fasting on evaluation of gastrointestinal transit with charcoal meal. **Journal of Pharmacological And Toxicological Methods**, v. 52, n. 1, p. 154-154, 2005.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative And Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.

MORE, S. S.; RAZA, A.; VINCE, R. The butter flavorant diacetyl, forms a covalent adduct with 2-deoxyguanosine, uncoils DNA, and leads to cell death. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3311-3317, 2012a.

MORE, S. S.; VARTAK, A. P.; VINCE, R. The butter flavorant diacetyl, exacerbates beta-amyloid cytotoxicity. **Chemical Research in toxicology**, v. 25, n. 10, p. 2083-2091, 2012b.

MORGAN, D. L.; JOKINEN, M. P.; PRICE, H. C.; GWINN, W. M.; PALMER, S. M., FLAKE, G. P. Bronchial and bronchiolar fibrosis in rats exposed to 2,3-pentanedione vapors: implications for bronchiolitis obliterans in humans? **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 3, p. 448-465, 2012.

MU, L. H.; HUANG, Z. X.; LIU, P.; HU, Y.; GAO, Y. Avaliação de toxicidade oral aguda e subcrônica da fórmula erval Kai-Xin-San. **Journal Ethnopharmacology**, v. 138, p.351-357, 2011.

NEUMANN, I. D.; WEGENER, G.; HOMBERG, J. R.; COHEN, H.; SLATTERY, D. A.; ZOHAR, J.; OLIVIER, J. D. A.; MATHÉ, A. A. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1357-1375, 2011.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D.; KIAMA, S. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacology Online**, v. 2, p. 458-78, 2011.

NOGUEIRA-NETO, J. D.; ALMEIDA, A. A. C.; SILVA, O. A.; CARVALHO, R. B. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do nerolidol em camundongos. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**, v. 08, p. 42-56, 2012.

NUNES, R. D. M.; SALES, I. M. S.; SILVA, S. I. O.; SOUSA, J. M. C.; PERON, A. P. Antiproliferative and genotoxic effects of nature identical and artificial synthetic food additives of aroma and flavor. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 150-154, 2017.

WHITE, K. L.; HEIKKILA, K.; WILLIAMS, R.; LEVIN, L.; LOCKEY, J.E.; RICE, C. Diacetyl exposures at four microwave popcorn plants. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 7, n. 4, p. 185-193, 2010.

YOUNESI, E.; AYSELI, M. T. An integrated systems-based model for substantiation of health claims in functional food development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2015.

OKONKWO, C. O. J.; EHILEBOH, A. D.; NWOBODO, E.; DIKE, C. C. The effects of acute gasoline vapour inhalation on some haematological indices of albino *Wistar* rats. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 2, p. 123-125, 2016.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). OECD 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Paris: OECD, 2001.

OLIVEIRA, V. A.; OLIVEIRA, V. M. A.; OLIVEIRA, T. W. N.; DAMASCENO, A. N. C.; SILVA, C. E. O.; MEDEIROS, S. R. A.; SOARES, B. M.; SILVA, F. C. C.; AGUIAR, R. P. S.; ISLAM, M. T.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; PERON, A. P.; CASTRO E SOUSA, J. M.; Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of two artificial sweeteners by using eukaryotic test systems. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 547-551, 2017.

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

ROBERTS, R.; CALLANDER, R.; DUFFY, P.; JACOBSEN, M.; KNIGHT, R.; BOOBIS, A. Target organ profiles in toxicity studies supporting human dosing: Does severity progress with longer duration of exposure. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 737-746, 2015.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 3, p. 289-304, 1997

RODRIGUES, J. V. L.; BERTGES, L. C.; PIMENTEL, C. F. M. G.; NEVES, P. O.; BORMANN, R. L.; JÚNIOR, J.; NARDELLI, P. R.; TOLEDO, G. C. TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DE *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Rodentia:Muridae) APÓS ADMINISTRAÇÃO DE TEGASERODE **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 21, n. 4, p. 138-146, 2014.



- SAATLOO, N. V.; SADIGHARA, P.; KHANIKI, G. J.; EBRAHIMI, N.; NABIZADEH, S. Evaluating the interaction effects of using common synthetic food dyes and aspartame by *Artemia salina* toxicity test. **Journal of Food Safety and Hygiene**, v.1, n.1, p.13-17, 2015.
- SALES, I. M. S.; BARBOSA, J. S.; SANTOS, F. K. S.; SILVA, F. C. C.; FERREIRA, P. M. P.; CASTRO e SOUSA, J. M.; PERON, A. P. Assessment of grape, plum and orange synthetic food flavourings using *in vivo* acute toxicity tests. **Food Technol Biotechnol**, v. 55, n. 1, p. 131-137, 2017a.
- SALES, I. M. S.; SANTOS, F. K. S.; CASTRO E SOUSA, J. M.; PERON, A. P. Toxicidade aguda em nível celular de aromatizantes de Biscoito e Tufti-fruți em associação. **Multitemas**, v. 22, n. 51, p. 253-267, 2017b.
- SALES, I. M. S.; SILVA, J. M.; MOURA, E. S. R.; ALVES, F. D. S.; SILVA, F. C. C.; SOUSA, J. M. C.; PERON, A. P. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. **Brazilian journal of biology**, 2017c.
- SALINAS, R. D. **Alimentos e nutrição: introdução à bromatologia**. Porto Alegre: Artmed. p. 278, 2002.
- SASAKI, Y. F.; KAWAQUCHI, S.; KAMAYA, A.; OSSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIQUCHI, 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, n. 1-2, p.103-119, 2002.
- SCHRODER, V.; BUCUR, L.; PAVALACHE, G. International Multidisciplinary Scientific Conference on Social Sciences and Arts. The cytotoxicity study of the common pharmaceutical or food additive. **SGEM2014 Conference Proceedings**, v. 2, p. 913-920, 2014.
- SHIBAMOTO, T. Diacetyl: occurrence, analysis and toxicity: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 4048-4053, 2014.
- SJÖSTEDT, N.; DENG, F.; RAUVALA, O.; TEPPONEN, T.; KIDRON, H. Interaction of Food Additives with Intestinal Efflux Transporters. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 3824-3833, 2017.
- STEIN, A.; VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 2, n. 1, p. 51-63. 2010.
- TRAESEL, G. K.; SOUZA, J. C.; BARROS, A. L.; SOUZA, M. A.; SCHMITZ, W. O.; MUZZI, R. M.; OESTERREICH, S. A.; ARENA, A. C. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 320-325, 2014.
- VEIGA, L. F.; VITAL, N. 2002. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo

Artemia sp. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria: São Paulo, p.111-122.

VIAUD-DELMON, I.; VENAULT, P.; CHAPOUTHIER, G. Behavioral models for anxiety and multisensory integration in animals and humans. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1391–1399, 2011.

XU, Z.; GU, C.; WANG, K.; JU, J.; WANG, H.; RUAN, K.; FENQ, Y. Arctigenic acid, the key substance responsible for the hypoglycemic activity of Fructus arctii. **Phytomedicine**, v. 22, n. 1, p. 128–137, 2015.

ZACCONE, E.J.; GOLDSMITH, W.T.; SHIMKO, M.J.; WELLS, J.R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; WILLARD, P.A.; CASE, S.L.; THOMPSON, J.A.; FEDAN, J.S. Diacetyl and 2,3-pentanedione exposure of human cultured airway epithelial cells: ion transport effects and metabolism of butter flavoring agents. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 542-549, 2015.

# **ANEXOS**

## ANEXO A – Avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Segurança toxicológica e aromatizantes alimentares: análises *in vitro* e *in vivo***", registrada nº **256/16**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA**– Núcleo de Tecnologia Farmacêutica/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **04/11/2016**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Janeiro/ 2017 à Dezembro/2019
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de Animais	131
Peso/ Idade	20 a 30/ 2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias-CCA/UFPI.

Teresina, 04 de Novembro de 2016.

  
**Prof.ª Ives L. de Mendonça**  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

**ANEXO B – Avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 13 de Março de 2015.

Ilmo.

**Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA.**  
**Departamento: Biofísica e Fisiologia/CCS/UFPI.**

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (13 de Março de 2015), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **008/15**, o projeto de pesquisa intitulado **"Protocolo de manutenção do Tumor experimental Sarcoma 180 para uso na pesquisa de substâncias quimioprolifáticas e quimioterápicas"**, sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Abril/2015 à Novembro/2017, e serão usados 720 Camundongos (Machos ou Fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

  
**Prof.ª Ivete L. de Mendonça**  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

ANEXO C – Produção Científica gerada no período do mestrado.



# Certificado



Certificamos que NARCIA MARIANA FONSECA NUNES , Edymilaís da Silva Sousa, Ian Djhemes Oliveira Sousa, Antonia Maria das Graças Lopes Citó, Paulo Michel Pinheiro Ferreira apresentaram o trabalho "ANÁLISE QUÍMICA DO AROMATIZANTE DE MANTEIGA E SCREENING DE TOXICIDADE AGUDA " na sessão Painel no III Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas, III Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos e do II Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, realizado no período de 26 a 28 de Abril de 2017 na Universidade Federal do Piauí na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Teresina, Piauí, 19 de Junho de 2017.

*Hilris Rocha e Silva*  
Hilris Rocha e Silva  
Presidente II Simpósio Internacional  
de Farmácia Clínica

*Lívio César Cunha Nunes*  
Lívio César Cunha Nunes  
Presidente

*Ana Paula dos S.C.S. da Silva*  
Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva  
Comissão Científica

Anexo D – Produção Científica gerada no período do mestrado.



# Certificado



Certificamos que NARCIA MARIANA FONSECA NUNES , Lara Pulyana Silva Ramos, Denise Trigueiro dos Santos, Débora Caroline do Nascimento Rodrigues, Ana Paula Peron, Paulo Michel Pinheiro Ferreira apresentaram o trabalho "Screening hipocrático e comportamental de animais tratados com um aromatizante comercial" na sessão Painel no III Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas, III Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos e do II Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, realizado no período de 26 a 28 de Abril de 2017 na Universidade Federal do Piauí na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Teresina, Piauí, 19 de Junho de 2017.

*Hilris Rocha e Silva*  
Hilris Rocha e Silva

Presidente II Simpósio Internacional  
de Farmácia Clínica

*Lívio César Cunha Nunes*  
Lívio César Cunha Nunes  
Presidente

*Ana Paula dos S.C.L. da Silva*  
Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva  
Comissão Científica