

**Universidade Federal do Piauí**

**Toxicidade e citogenotoxicidade de aditivos corantes utilizados na  
fabricação de alimentos e rações animais**

**Ana Paula Soares e Silva**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Piauí como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento, área de concentração em  
Genética e Melhoramento, para obtenção do  
título de “Mestre”.**

**Teresina  
2018**



**Ana Paula Soares e Silva**  
**Licenciada em Ciências Biológicas**

**Toxicidade e citogenotoxicidade de aditivos corantes utilizados na fabricação  
de alimentos e rações animais**

Orientadora:

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Peron**

Coorientador:

**Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Piauí como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento, área de concentração em  
Genética e Melhoramento, para obtenção do  
título de “Mestre”.**

**Teresina**  
**2018**

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

**S586t** Silva, Ana Paula Soares e  
Toxidade e citogenotoxicidade de aditivos corantes  
utilizados na fabricação de alimentos e ração animal / Ana  
Paula Soares e Silva  
- 2018.  
63 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do  
Piauí, Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, Teresina, 2018.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron

1. Aditivos 2. *Artemia salina* 3. *Allium cepa* I.Título

**CDD 664.06**

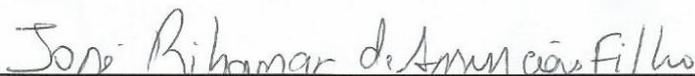
**Toxidade e citogenotóxicidade de aditivos corantes utilizados na fabricação de alimentos e rações animais**

**Ana Paula Soares e Silva**

**Licenciada em Ciências Biológicas**

**Aprovada em 30/08/2018**

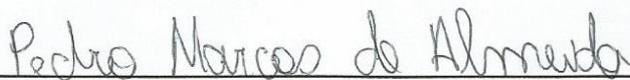
**Comissão Julgadora:**



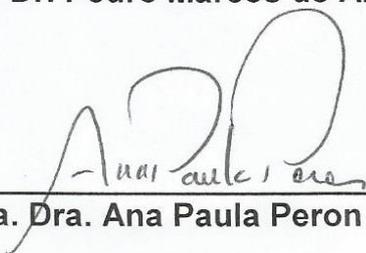
**Prof. Dr. José Ribamar Assunção Filho - UEMA**



**Profa. Dra. Verônica Brito da Silva - CCA/UFPI**



**Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida - UESPI  
(Coorientador)**



**Profa. Dra. Ana Paula Peron - UTFPR  
(Orientadora)**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me manter firme nos momentos mais incertos, não me deixando perder a fé de que tudo sempre dará certo.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron por quem tenho profunda admiração e gratidão pela parceria, incentivo e pelas contribuições para a realização desta pesquisa desde os primeiros passos.

Aos meus colegas de turma pela amizade e pelas contribuições durante esses dois últimos anos, em especial às minhas amigas Bruna Maria Prado da Silva, Auricélia de Sousa Carvalho e aos meus amigos Géron do Nascimento Costa e Thales Galdino Andrade que se tornaram verdadeiros irmãos.

Um agradecimento mais que especial à minha amiga Tamires de Sousa Silva, por ter sido minha companheira nessa jornada tão árdua e também pela bela relação de amizade que construímos.

Aos meus parceiros do Laboratório de Pesquisa I, em Picos, por terem me recebido tão bem, pela amizade e pelo companheirismo.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiane de Lima Feitosa por contribuir cedendo seu espaço no Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais para a conclusão de parte das análises.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida pelo apoio e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Raimundo Nonato Oliveira Silva pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos membros da banca, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Brito da Silva, prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron e prof. Dr. José Ribamar de Assunção Filho que prontamente aceitaram o convite e também pelas valiosas contribuições.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento juntamente com os professores e à Capes/CNPq pelo apoio financeiro.

Ao meu amor, Jefferson Lucas Matias Sousa pela paciência nos dias difíceis e por ser meu melhor amigo.

Aos meus dez irmãos, em especial à Magda Soares e Silva (*in memoriam*) por

ter sido a primeira a acreditar em mim e por ter dado os primeiros passos para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus pais, Dorides Soares e Silva e Martins Alves e Silva por serem meu alicerce e pelo exemplo de vida, pois apesar de não terem tido a oportunidade de estudar, sempre lutaram para que os filhos se tornassem pessoas de bem e conseguissem uma boa formação.

À Dayane Pereira de Castro, Vivianne Carvalho da Silva, Raphaella Larissa Antunes Marquez, Emilly Denise Silva Pinho, pessoas muito queridas que fazem parte da minha vida.

**SUMÁRIO**

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMO</b> .....   | 7  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 8  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | 9  |
| <b>LISTA DE QUADROS</b> .....   | 10 |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | 11 |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 14 |
| 2.1 O uso de corantes na indústria alimentícia e no mercado de ração animal.....                                    | 14 |
| 2.2 Categorias dos corantes alimentares.....  | 16 |
| 2.3 Corante Dióxido de titânio.....   | 18 |
| 2.4 Corante Carmin.....   | 20 |
| 2.5 Corante Caramelo.....   | 22 |
| 2.6 Potencial tóxico dos corantes alimentares.....  | 24 |
| 2.7 Sistema teste <i>Allium cepa</i> L. ....  | 28 |
| 2.8 Sistema teste <i>Artemia salina</i> L.....  | 31 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 33 |
| 3.1 Obtenção dos corantes e determinação das concentrações para avaliação de toxicidade em <i>Allium cepa</i> ..... | 33 |
| 3.2 Teste <i>Allium cepa</i> L.....   | 33 |
| 3.3 Determinação das concentrações para avaliação de toxicidade em <i>Artemia salina</i> .....                      | 35 |
| 3.4 Teste <i>Artemia salina</i> L. ....   | 35 |
| 3.5 Análises estatísticas.....  | 36 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 36 |
| <b>5. CONCLUSÕES</b> .....  | 47 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 48 |

## RESUMO

SILVA, A. P. S. **Toxicidade e citogenotoxicidade de aditivos corantes utilizados na fabricação de alimentos e rações animais.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento.), UFPI, Teresina, 2018.

Os corantes alimentares são uma categoria de aditivos com importante relevância para a indústria alimentícia por melhorar a aparência dos alimentos destinados a humanos e animais. No entanto, uma série de questionamentos quanto aos níveis de segurança para o uso desses aditivos têm sido feitos nos últimos anos. Por esse motivo, o corante inorgânico dióxido de titânio, o natural carmim e o corante sintético idêntico ao natural caramelo IV foram avaliados quanto a toxicidade e a citogenotoxicidade frente aos bioensaios *Allium cepa* e *Artemia salina* em 24 e 48 horas de exposição. Para o Dióxido de titânio foram avaliadas as concentrações 25; 50; 100; 200; 400 g/1000 mL (corante/água destilada); para o Carmim 10 mL/10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mL (corante/água destilada) e para o caramelo 1; 10; 20; 30; 40 mL/1000 mL (corante/água destilada) em células meristemáticas de *Allium cepa*. Para *Artemia salina* as concentrações com intervalo de 125.000 a 122,07 ppm para o dióxido de titânio e carmim e 7.812,50 a 61,04 ppm para o caramelo foram utilizadas para avaliação de toxicidade. Em *Allium cepa*, as células foram analisadas totalizando 3.000 para cada controle e tempo de exposição cuja análise dos resultados para citogenotoxicidade foi feita pelo software R com o teste não paramétrico de Kruskal Wallis a 5%, os resultados mostraram que todas as concentrações do dióxido de titânio causaram significativa redução do índice mitótico, sendo que nas concentrações 200 e 400 g/1000 mL em 48 horas de exposição esse efeito foi ainda mais efetivo apresentando-se como significativo em relação ao controle e também ao tempo de exposição de 24 horas. Não diferente, o carmim e o caramelo também reduziram o índice de divisão celular logo nas 24 horas de exposição, condição que se manteve para todas as concentrações em 48 horas de exposição. Para *Artemia salina* a análise de regressão mostrou que os produtos foram tóxicos para os náuplios causando mortalidade, condição essa que ampliou em concentrações maiores e maior tempo de exposição. Assim, esses resultados confirmam o efeito tóxico dos corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo sobre os sistemas testes avaliados demonstrando a necessidade de controle no uso desses aditivos pelas principais agências reguladoras.

**Palavras-chave:** Aditivos, *Artemia salina*, *Allium cepa*

## ABSTRACT

SILVA, A. P. S. **Toxicity and cytotoxicity of coloring additives used in the manufacture of food and animal feed.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento.), UFPI, Teresina, 2018.

Food colorings are a category of additives with important relevance to the food industry for improving the appearance of food intended for humans and animals. However, a number of questions regarding safety levels for the use of these additives have been made in recent years. For this reason, inorganic dye titanium, natural carmine and synthetic dye identical to natural caramel IV were evaluated for toxicity and cytogenotoxicity in relation to the bioassays *Allium cepa* and *Artemia salina* in 24 and 48 hours of exposure. For titanium dioxide the concentrations 25 were evaluated; 50; 100; 200; 400 g / 1000 mL (dye / distilled water); for carmine 10 mL / 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625 mL (dye / distilled water) and for caramel 1; 10; 20; 30; 40 mL / 1000 mL (dye / distilled water) in *Allium cepa* meristematic cells. For *Artemia salina* concentrations ranging from 125,000 to 122,07 ppm for titanium dioxide and carmine and 7,812.50 to 61,04 ppm for caramel were used for toxicity evaluation. In *Allium cepa*, the cells were analyzed totaling 3,000 for each control and exposure time whose analysis of the results for cytogenotoxicity was performed by software R with the non-parametric Kruskal Wallis test at 5%, the results showed that all concentrations of titanium caused a significant reduction in the mitotic index, and in the concentrations of 200 and 400 g / 1000 mL in 48 hours of exposure this effect was even more effective, being significant in relation to the control and also the time of exposure of 24 hours. Similarly, carmine and caramel also reduced cell division rate within 24 hours of exposure, a condition that persisted for all concentrations within 48 hours of exposure. For *Artemia salina* the regression analysis showed that the products were toxic to the nauplii causing mortality, a condition that increased in higher concentrations and longer exposure time. Thus, these results confirm the toxic effect of dyes titanium dioxide, carmine and caramel on the evaluated test systems demonstrating the need for control in the use of these additives by the main regulatory agencies.

Key words: Additives, *Artemia salina*, *Allium cepa*.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*. (A) Broto nuclear (B) Prófase poliplóide (C) Célula binucleada (D) C-metáfase (E) Metáfase com quebra cromossômica (F-G) Aderências cromossômicas (H) Metáfase com perda cromossômica (I) Metáfase poliplóide (J) Anáfase com ponte cromossômica (K) Anáfase multipolar (L) Anáfase com perda cromossômica (M) Anáfase com quebra cromossômica (N) Anáfase poliplóide (O) Telófase com perda cromossômica (P) Telófase com ponte (Q) Telófase com atraso (R) Núcleo lobulado (S-T) Micronúcleo. Adaptado de: BIANCHI; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016.....28
- FIGURA 2** – Morfologia do minicrustáceo *A. salina* Leach nos diferentes estágios do ciclo de vida. Fonte: SEYFRIED, 2017.....31
- FIGURA 3** – Percentuais de cada fase de divisão celular em relação aos tempos de exposição e concentrações avaliadas em *A. cepa* para os corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo.....42
- FIGURA 4** – Toxicidade dos corantes dióxido de titânio (A e B), carmim (C e D), e caramelo (E e F) frente ao bioensaio *A. salina* em 24 e 48 horas de exposição.....44

## LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1** – Corantes artificiais permitidos no Brasil, nomes, cor, ingestão diária aceitável (IDA) e limites máximos para humanos e animais.....16
- QUADRO 2** – Classificação do corante Caramelo pelo JECFA, UE e INS de acordo com os reagentes utilizados, carga elétrica e IDA.....22

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** – Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo.....36

**TABELA 2** – Índices de alterações cromossômicas observadas em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos corantes Dióxido de titânio, carmim e caramelo.....39

## 1. INTRODUÇÃO

Aditivos alimentares são substâncias utilizadas para conservar, aumentar a vida útil dos alimentos, conferir ou alterar sabor, regular a acidez, melhorar ou corrigir a aparência de produtos industrializados, bem como para adicionar cor e melhorar o aspecto após o processamento e/ou tempo de estocagem, entre outros usos (RAJAN; SIMON; BOSSO, 2013; TOMASKA; BROOKE-TAYLOR, 2014; KHODARAHMI; ASHRAFI-KOOSHK; KHALEDIAN, 2015). Dentre esses aditivos, os corantes têm significativa relevância por serem úteis na melhoria da aparência de alimentos destinados a alimentação humana e animal, por tornar o produto mais atrativo influenciando diretamente no poder de escolha do consumidor (ROVINA et al., 2016)

A *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelecem as normas de uso para esses aditivos no mundo (BRASIL, 1999, XU et al., 2015). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os corantes destinados para alimentos e rações em orgânico natural, orgânico sintético, artificial, orgânico sintético idêntico ao natural, inorgânico, caramelo e caramelo (processo amônia) (BRASIL, 1997). Esse órgão é também responsável pelas regulamentações de uso e fiscalização quanto a aplicação e os efeitos toxicológicos dos corantes em humanos.

Dentre os corantes empregados na indústria de alimentos industrializados, semi-industrializados e rações o carmin (corante natural) (NETTO, 2009; HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013), o dióxido de titânio (corante inorgânico) (BRASIL, 1999; COIMBRA et al. 2017) e o caramelo (processo amônia) estão dentre os mais utilizados (BRASIL, 2015).

Porém, estudos referentes a toxicidade e citogenotoxicidade desses corantes alimentares ainda são incipientes, o que justifica a urgência na realização de estudos de avaliação da toxicidade desses compostos a partir de diferentes bioensaios. Louzada et al. (2015) relatam que mais de 40% dos cânceres em humanos ocorrem devido a dietas inadequadas, ricas em aditivos alimentares.

Bioensaios com plantas são sensíveis e simples para monitorar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diversos produtos (HERRERO et al., 2012). Entre esses, o sistema teste *Allium cepa* (cebola) é considerado como um bioensaio eficiente para estudos de toxicidade e citogenotoxicidade em nível celular (TABREZ

et al., 2011; LACERDA; MALAQUIAS; PERON, 2014). Isso se deve pelas suas propriedades de rápida proliferação e grandes cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ), o que facilita a detecção da citotoxicidade, pela inibição ou proliferação celular excessiva, e alterações celulares e anormalidades do fuso mitótico quando esse organismo é exposto a substâncias com atividade genotóxica (HERRERO et al., 2012; CARDOSO et al., 2014). *A. cepa* foi utilizado para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de flavorizantes (SILVA et al., 2016) e produtos industrializados, como sucos em pó (BEZERRA et al. 2016) e leite em pó (MOURA et al., 2017) e corantes (OLIVEIRA et al., 2013; GOMES et al., 2013)

*Artemia salina* (camarão de salmoura) também é considerada um organismo teste apropriado para avaliação de toxidade de diversos compostos químicos devido ao seu ciclo de vida curto, facilidade no manuseio da cultura e tolerância a diferentes condições ambientais (NACEUR; JENHANI; ROMDHANE, 2012). Náuplios dessa espécie foram úteis como sistema teste na avaliação da toxicidade de corantes artificiais (VAKILI-SAATLOO et al., 2015).

Desse modo, por meio deste trabalho buscou-se avaliar a toxidade, citotoxicidade e genotoxicidade dos corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo (processo de amônia) sob diferentes concentrações e tratamentos frente as células meristemáticas de *A. cepa* e a larvas de *A. salina*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O uso de corantes na indústria alimentícia e no mercado de ração animal

Os aditivos alimentares são quaisquer ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais. Dentre estes aditivos, os corantes são considerados essenciais para a indústria de alimentos (BRASIL, 2002; CUNHA, 2008). Corante alimentar, de acordo com a Portaria 540/97 da Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da saúde (SVS/MS), é definido como toda substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento durante o processo de industrialização.

Para o Ministério da Agricultura, os aditivos alimentares são as substâncias que, incorporadas nos alimentos para animais, são susceptíveis de influenciar as suas características ou a produção animal, sendo esses classificados nas seguintes categorias: tecnológicos, sensoriais, nutricionais, zootécnicos e anticoccidianos. Os corantes encaixam-se na categoria de aditivos sensoriais (BRASIL, 2004).

O Brasil define as normas de inspeção e fiscalização de produtos destinados à alimentação animal pela lei 6.198 de 26 de dezembro de 1974. A instrução normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004 aprova o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal segundo as boas práticas de fabricação contendo os registros sobre a avaliação da segurança de uso, registro e comercialização de produtos destinados a alimentação animal (BRASIL, 2004).

Na União Europeia a legislação para aditivos em alimentos destinados para animais é determinada pelo regulamento da Comunidade Europeia EC, 2003 nº 1831/2003 e diretiva 2003/7/EC, que determinam as normas para o uso de aditivos na nutrição animal e determinam os procedimentos para autorização, venda e rotulagem desses produtos. De acordo com essa diretiva, os corantes são substâncias que melhoram ou mudam as propriedades organolépticas da alimentação ou as características visuais do alimento direcionado a alimentação animal.

Por muito tempo os corantes foram derivados somente de produtos naturais, como folhas, flores, frutos, e de substâncias extraídas de animais. Estas extrações envolviam diferentes e trabalhosas etapas, como maceração, destilação, fermentação, decantação e precipitação (SOUZA, 2012). Porém, no final do século

XIX, com o estabelecimento de novas tecnologias decorrentes da área de ciência e tecnologia, o mercado de corantes artificiais alcançou um espaço de destaque na indústria de alimentos (POLÔNIO, 2010).

Isso foi possível pela descoberta de métodos de fabricação eficaz e baratos, também porque esses elementos eram adequados para “restaurar” a cor do leite e de produtos alimentares adulterados (ARIT, 2011). Antes dessa época o emprego de pigmentos naturais prevalecia, porém com variações de cores limitadas (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011).

O uso de corantes garante benefícios a indústria de alimentos, em virtude de que para o mercado consumidor, a cor dos alimentos influencia diretamente na compra ou não de determinado produto. Ao lado de fatores como a suculência, sabor, maciez ou textura, essa característica sensorial é determinante para a aceitação do alimento ou produto pois a cor influencia, principalmente, na percepção do sabor (GONZÁLEZ; GARCÍA; NAZARENO, 2010). A cor também interfere nos aspectos de doçura (VENTURINI et al., 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A adição de corantes nos alimentos contribui, para além da restauração da cor, adicionar essa característica em alimentos incolores e uniformizar produtos que são produzidos com matérias-primas de origem diversas (VELOSO, 2012). No entanto, o uso desse recurso é condicionado pela indicação do nome do corante ou INS (Sistema Internacional de Numeração) no rótulo das embalagens, sendo obrigatório que seja diferenciado dos ingredientes (BRASIL, 2002).

O INS foi elaborado pelo Comitê do *Codex Alimentarius* da Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) que estabelece um sistema numérico de identificação de aditivos alimentares. No Brasil esse procedimento é realizado pelo Ministério da Saúde e fiscalizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (AUN et al., 2011).

Em se tratando da rotulagem de alimentos para consumo animal, a legislação prevê que os aditivos utilizados na formulação dos produtos devem ser indicados no rótulo (BRASIL, 2009b), porém não há especificação das substâncias permitidas, os limites máximos permitidos ou ingestão diária aceitável (IDA). Dessa forma, subentende-se que essas regulamentações são derivadas daquelas utilizadas para humanos (SIMÃO, 2010).

Portanto, o controle no uso de ingredientes e aditivos alimentares envolvidos na formulação de alimentos é uma forma de garantir a segurança alimentar também dos animais, já que muitos aditivos, como os corantes, podem causar efeitos nocivos como alergias e distúrbios de comportamento.

## 2.2 Categorias dos corantes alimentares

A resolução nº 44 de 1977 elaborada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), define as categorias de corantes de uso permitido em alimentos, bebidas em: orgânico natural, orgânico sintético, artificial, orgânico sintético idêntico ao natural, inorgânico, caramelo e caramelo (processo amônia).

Dentre os corantes sintéticos amplamente utilizados em alimentos e rações destacam-se os aditivos de cor pertencentes a classe azo (MORRISON; WRIGHT; JOHN, 2011; BRASIL, 2010). O dióxido de titânio, o caramelo, e o corante natural carmim também são destaques entre os corantes produzidos e utilizados pela indústria na fabricação de alimentos para humanos e de emprego também em ração animal segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2010).

No entanto, a utilização desses corantes gera questionamentos entre profissionais de saúde quanto aos seus potenciais efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Tais questionamentos se dão em razão de haverem poucos estudos toxicológicos envolvendo estes aditivos. No Brasil, a legislação vigente permite o uso de onze corantes artificiais para a confecção de alimentos industrializados.

No Quadro 1 estão descritos os nomes comerciais, os códigos de identificação utilizados no Brasil, a cor referente, o Índice de Ingestão Diária (IDA) segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), os limites máximos permitidos para balas, confeitos, bombons, chocolates e similares, conforme descrito na resolução nº 387 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1999) e os limites de uso para fabricação de ração animal (BRASIL, 2010).

**QUADRO 1.** Corantes artificiais permitidos no Brasil, nomes, cor, ingestão diária aceitável (IDA) e limites máximos para fabricação de alimentos para humanos e animais.

| <b>Nome comercial</b> | <b>Código de identificação</b> | <b>Cor</b>       | <b>IDA (mg/kg de peso corpóreo)</b> | <b>Limite máximo mg/100g</b> | <b>Limites de uso para animais</b> |
|-----------------------|--------------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Amaranto              | E123                           | Magenta          | 0,50                                | 10,0                         | Sem restrição                      |
| Amarelo crepúsculo    | E110                           | Laranja          | 2,50                                | 10,0                         |                                    |
| Azorrubina            | E122                           | Vermelho         | 4,00                                | 5,00                         |                                    |
| Azul brilhante        | E133                           | Azul turquesa    | 10,0                                | 30,0                         |                                    |
| Azul patente V        | E131                           | Azul             | 15,0                                | 30,0                         |                                    |
| Eritrosina            | E127                           | Pink             | 0,10                                | 5,00                         |                                    |
| Indigotina            | E132                           | Azul royal       | 5,00                                | 30,0                         |                                    |
| Ponceau 4R            | E124                           | Cereja           | 4,00                                | 10,0                         |                                    |
| Verde rápido          | E143                           | Verde mar        | 10,0                                | 30,0                         |                                    |
| Vermelho 40           | E129                           | Verde alaranjado | 7,00                                | 30,0                         |                                    |
| Tartrasina            | E102                           | Amarelo limão    | 7,50                                | 30,0                         |                                    |

Fonte: Adaptado de: BRASIL (1999); BRASIL (2010)

O controle de uso dos aditivos alimentares no Brasil é feito por meio do Comitê Permanente em Aditivos Alimentares (CPAA) juntamente com a ANVISA. Estes órgãos de segurança determinam, com base em resultados de estudos toxicológicos, os limites máximos permitidos para consumo (FENG; CERNIGLIA; CHEN, 2012, FÁVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011).

Nesse cenário, os corantes artificiais têm sido substituídos de forma gradativa pelos naturais por estes terem menos evidências de riscos à saúde, e apesar de

apresentarem algumas desvantagens (baixa estabilidade e alto custo) estão sendo cada vez mais utilizados em detrimento dos artificiais (GOMES, 2012).

Entre as principais fontes de obtenção de corantes naturais estão as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos e bactérias) (MENDONÇA, 2011). Alguns corantes naturais como o extrato de urucum, curcumina, antocianinas, betalaínas e carmim de cochonilha estão entre aqueles mais comercializados. (NETO, 2009; HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013)

Com relação aos corantes sintéticos idênticos aos naturais, são também bastante explorados na indústria de alimentos e de rações animais sendo o corante caramelo classe IV um de seus principais representantes (BRASIL, 2015). Do grupo dos corantes inorgânicos, o dióxido de titânio ocupa posição de destaque como um dos mais utilizados para diversos gêneros alimentícios (COIMBRA et al., 2017).

Assim, pela relevância do uso do corante, dióxido de titânio, carmim e caramelo na indústria de alimentos, estudos referentes a toxicidade desses compostos são relevantes para proporcionar bem-estar ao mercado consumidor.

### 2.3 Corante Dióxido de titânio

O dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) é um material quimicamente inerte que exhibe uma série de polimorfos. As fases cristalinas mais comuns na natureza são bruquita, anatase e rutilo (SKOCAJ et al., 2011). Neste trabalho o corante utilizado é de natureza rúflica e composto por nanopartículas, no entanto não foram especificadas em quais quantidades e os tamanhos dessas partículas.

Segundo Periasamy et al. (2015) examinaram diversas categorias de produtos contendo o dióxido de titânio e o próprio corante de grau alimentício com o uso de microscópio eletrônico de transmissão e espectros de raio x por dispersão de energia, verificou-se partículas de 40-200nm, cujo tamanho médio foi de 42nm.

O  $\text{TiO}_2$  pode ser extraído de fontes minerais naturais (rutilo, ilmenita e minérios leucocênicos) e ser utilizado em processos industriais de síntese (CLEMENTE et al., 2012). Seu uso é muito promissor em diversos produtos pela sua facilidade de absorção de luz ultravioleta (SUTARIYA et al., 2015).

Pelo Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (INS) do Codex Alimentarius, o  $\text{TiO}_2$  é identificado com INS 171. A ANVISA o reconhece como

aditivo alimentar com função corante e define seu uso de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), o que significa que ele não possui um nível de ingestão diária especificado e pode então ser utilizado em quantidade suficiente para se obter o efeito desejado.

Com relação as categorias de produtos alimentícios cujo o uso do  $\text{TiO}_2$  é permitido pela ANVISA podem ser citados os produtos de confeitaria, balas, biscoitos, coberturas, xaropes, bebidas não alcoólicas, suplementos vitamínicos e minerais, sopas e caldos prontos para consumo, barras de cereais, dentre outros (ANVISA 1999), além de rações destinadas ao consumo animal, principalmente de cachorros e gatos (BRASIL, 2010).

O  $\text{TiO}_2$  apresenta-se de duas formas distintas: em micropartículas, tamanho de 0.1 a 100 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) e nanopartículas (NP) com dimensão de 1 a 100nm. Com relação as NPs, são mais estudadas, uma vez que apresentam propriedades específicas relacionadas à forma (estrutura cristalina), tamanho, superfície (área de superfície/carga de superfície) e química (composição, solubilidade, superfície química, aglomeração/agregação) (FADEEL; PIETROIUSTI; SHVEDOVA, 2012; SUTARIYA et al., 2015; GWINN; SOKULL-KLUTTGEN, 2012).

As nanocápsulas de dióxido de titânio são produzidas em grande escala na indústria. Trata-se de um pó branco muito utilizado na fabricação de cosméticos, protetores solares, aditivos farmacêuticos, corantes alimentares, microeletrônica, semicondutores, medicamentos e componentes eletrônicos (NIOSH, 2011; SKOCAJ et al., 2011).

Aspectos relacionados a toxicidade desse corante são controversos, pois ainda existem poucos estudos nessa área. O que se sabe é que quando sintetizado em micropartículas seus efeitos tóxicos são menos aparentes, porém em nanopartículas; pode causar efeitos tóxicos em mamíferos com prejuízos nas vias respiratórias (inflamação, danos, fibrose e tumores nos pulmões, além de mau funcionamento dos macrófagos), distúrbios mitóticos, danos no DNA e apoptose (GWINN; SOKULL-KLUTTGEN, 2012). Isso se deve principalmente devido ao seu pequeno tamanho que pode penetrar estruturas biológicas básicas afetando sua função (ZHAO; CASTRANOVA, 2011)

Outra justificativa é a razão superfície-volume, que em tamanho nano são mais reativas em sistemas biológicos, dessa forma, sendo as proteínas as biomoléculas que mais interagem com NP, isso pode causar problemas em seu funcionamento e inativar enzimas importantes nas células (SUTARIYA et al., 2015; FADEEL; PIETROIUSTI; SHVEDOVA, 2012).

Atualmente, diversos corantes têm sido reavaliados quanto aos seus teores máximos permitidos, mas o dióxido de titânio continua com IDA indefinido. Os riscos de seu uso para a saúde pública ainda não são alarmantes, mas a presença de nanopartículas neste aditivo é um ponto que envolve muitos debates quanto a sua definição e enquadramento (COIMBRA et al., 2017).

Em São Paulo (SP), A Comissão de Meio Ambiente da Câmara aprovou o projeto de lei número 1370 de 2011 que proíbe em seu artigo primeiro o uso do dióxido de titânio em alimentos e cosméticos. A justificativa principal para essa determinação são os poucos registros de trabalhos sobre os riscos da substância (BRASIL, 2011). Tal fundamento é bastante consistente uma vez que o princípio da precaução determina que, “quando a informação científica é insuficiente, inconclusiva ou incerta e haja indicações de que os possíveis efeitos sobre o ambiente, a saúde das pessoas ou dos animais [...] possam ser potencialmente perigosos” (Milaré, 2015).

Portanto, estudos são cada vez mais necessários para elucidar os perigos relacionados a ingestão desse aditivo e estabelecer índices seguros de ingestão.

#### 2.4 Corante Carmim

O carmim é um corante vermelho natural obtido do exoesqueleto do inseto *Dactylopius coccus* Costa que vive em cactos (*Opuntia ficus-indica*) no Perú e nas Ilhas Canárias. O corante é muito utilizado em produtos de confeitaria, alimentos salgados, produtos de padaria, sorvetes, iogurtes, balas, bombons, sobremesas, alimentos de origem animal, marmeladas, picolés, gelatinas, bebidas alcoólicas, sopas, molhos, xaropes, conservas e laticínios, sucos, derivados lácteos, produtos cárneos em geral (GULTEKIN; DOGUC, 2013)

Também é útil na confecção de rações de animais, principalmente as de cachorro e gatos, além de ser aplicado na indústria farmacêutica e têxtil (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009; ARSLAN; AYCAN, 2014; KUNKELY; VOGLER, 2011).

Em derivados cárneos, seu uso é importante quando produz efeito semelhante ao sangue, causando a aparência de frescor (ROCHA et al., 2012)

Outrora, a extração do carmim era feita através da trituração de insetos desidratados pelo sol colocando-os posteriormente em água quente seguido da purificação do ácido carmínico, mas esse processo era muito demorado, além de dificultar a eficiência da extração. Hoje a produção envolve solventes orgânicos e hidróxidos que otimizam a produção em escala industrial (BORGES et al., 2012)

A tentativa de implantação do inseto no sertão do Brasil, para fins de produção do corante, fez com que fosse desenvolvida uma praga devido as condições climáticas da região. Por esse motivo, a obtenção do carmim no Brasil eleva o custo por conta da importação do próprio inseto ou do princípio ativo de países como o Perú, por exemplo. São inúmeras as espécies desse grupo que são utilizados para fins de produção de corantes vermelhos naturais, porém a mais expressiva comercialmente é a colchonilha americana (GOMES, 2012).

O corante natural carmim é de uso tolerado em alimentos e bebidas e é permitido pelas principais agências reguladoras de alimentos internacionais, como o *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Food Safety Authority* (EFSA) (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009; GOSETTI et al., 2015; LIM et al., 2014; BRASIL, 2007).

A ingestão diária aceitável do corante, conforme a FAO/WHO é de 5mg/kg de peso. Pela legislação brasileira as quantidades do uso do carmim como corante varia de acordo com a classe do produto. Em alimentos de origem animal, como carnes por exemplo, a concentração máxima permitida é de aproximadamente 0,01% da formulação (BRASIL, 2007).

Porém, apesar da tolerância de seu uso e também de ser considerado seguro, há registros sobre casos de hipersensibilidade relacionados ao contato e a ingestão do carmim (ACERO et al., 1998; CHUNG et al., 2001; VOLTOLINI et al., 2014). Quantidades aumentadas na dieta, além de reações alérgicas, causam hiperatividade na infância e tumores cutâneos em indivíduos sensíveis, com isso, alguns órgãos de apoio a crianças com hiperatividade tem solicitado que o corante seja eliminado da dieta (YILMAZ; ERGUN; YILMAZ, 2014)

Em nível celular, estudos voltados para a toxicologia desse aditivo se faz necessário, principalmente pelos poucos registros encontrados. Assim, pela constatação de efeitos adversos provocados pelo corante em outros procedimentos de pesquisa, vale a pena estudar seus efeitos a partir de testes em nível celular, como o que foi realizado neste estudo.

## 2.5 Corante Caramelo

Os corantes caramelos são produzidos pelo aquecimento de açúcares sob calor controlado e utilizados como aditivos de cor numa variedade de produtos alimentares e bebidas, além de também serem utilizados em outros tipos de produtos, como cosméticos, produtos farmacêuticos e ração animal (SENGAR; SHARMA, 2014).

Existem disposições para o uso de cores de caramelo em mais de 80 categorias de alimentos no Padrão Geral do *Codex alimentarius* para Aditivos Alimentares (GSFA) (CODEX, 2017). Com uma produção anual superior a 200.000 toneladas/ano, o corante caramelo representa cerca de 90% em peso de todos os corantes adicionados em alimentos, bebidas e rações consumidas no mundo (CRUZ et al., 2015).

O Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), comitê internacional de cientistas especialistas em aditivos alimentares da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, FAO/ONU, define o corante caramelo como uma mistura complexa de compostos, alguns dos quais na forma de agregados coloidais, fabricados pelo aquecimento de carboidratos, isoladamente ou na presença de ácidos, álcalis ou sais de grau alimentício (JECFA, 2008).

A sua classificação é dada de acordo com o processo pelo qual é obtido de acordo com os órgãos internacionais (JECFA, EU) e nacionais (INS), os reagentes utilizados na sua fabricação, a carga elétrica final do produto e sua IDA como mostrado no quadro abaixo (Quadro 2)

**QUADRO 2.** Classificação do corante Caramelo pelo JECFA, UE e INS de acordo com os reagentes utilizados, carga elétrica e IDA.

| CLASSIFICAÇÃO |                                  |      | REAGENTES UTILIZADOS  | CARGA ELÉTRICA | IDA (mg/kg peso corporal) |
|---------------|----------------------------------|------|---|----------------|---------------------------|
| JECFA         | EU                               | INS  |   |                |                           |
| Classe I      | Caramelo (E 150a)                | 150a | Com ou sem ácido, álcalis, sais, com exceção de sulfito e amônia  | –              | Ilimitada                 |
| Classe II     | Caramelo Sulfito básico (E 150b) | 150b | Com ou sem ácido, álcalis, sais, na presença de sulfitos (ácidos sulfurosos, sulfito e bissulfito de Na e K); não pode ser utilizado composto de amônia | –              | 0-160                     |
| Classe III    | Caramelo Amônia (E 150c)         | 150c | Com ou sem ácido, álcalis, sais, na presença de compostos de amônia (hidróxidos, carbonatos, fosfatos); não pode ser utilizado composto de sulfito      | +              | 0-200                     |
| Classe IV     | Caramelo Sulfito-amônia (E 150d) | 150d | Com ou sem ácido, álcalis, sais, na presença de compostos de amônia e sulfito   | –              | 0-200                     |

Abreviações: IDA: Ingestão Diária Aceitável; JECFA: Joint Expert Committee On Food Additives; UE: União Europeia; INS: Sistema Numérico Internacional. Adaptado de: ALMEIDA, 2011

O Brasil ocupa a terceira posição mundial em produção de refrigerantes, atrás apenas dos EUA e México, e os tipos mais consumidos nacionalmente são os do “tipo cola” e “guaraná”. O corante caramelo entra na formulação dos dois refrigerantes mais consumidos no Brasil, além de outros como o tutti-frutti e maçã. Só em 2008 a produção foi de 14,13 bilhões de litros, sendo os tipos cola e guaraná sozinhos responsáveis por cerca de 75% de toda produção (ABIR, 2011)

Em um estudo realizado por Pereira et al. (2015), indicaram que os aromatizantes, corantes e estabilizantes, foram os aditivos mais presentes em todas as categorias de alimentos avaliadas, sendo que o caramelo foi o que mais esteve presente sendo reportado em todas as categorias de alimentos avaliadas, com

destaque para os biscoitos, doces e sopas instantâneas. Também se encontra em várias marcas de rações para cachorro e gato.

## 2.6 Potencial tóxico dos corantes alimentares

Embora permitidos no Brasil, em muitos países alguns corantes alimentares, como o amaranto e a tartrazina, são vetados devido ao risco de serem carcinogênicos. Dessa forma, ressalta-se a importância no estabelecimento dos limites máximos permitidos dos aditivos de cor em alimentos e rações no sentido de informar a população quanto ao consumo consciente desses produtos (VELOSO, 2012).

Na década de 90 os primeiros testes de mutagenicidade e/ou carcinogenicidade de corantes alimentares foram realizados utilizando o corante azóico vermelho escarlate, onde este causou crescimento atípico quando injetado sob a pele da orelha de coelhos (LEDERER, 1990). Em 1924, observou-se que a ingestão desse corante por camundongos provocava a formação de adenomas hepáticos (MACKINSKI-JR, 1998). Desde então pesquisas foram realizadas a fim de elucidar aspectos referentes ao potencial tóxico e cancerígeno dos corantes alimentícios comercializados.

Souza (2015) buscou avaliar o potencial genotóxico dos corantes azóicos amarelo crepúsculo, tartrazina, vermelho 40 e ponceau 4R através do ensaio de micronúcleo. O teste *in vitro* foi aplicado em eritrócitos policromáticos extraídos da medula óssea do fêmur de 168 camundongos *Swiss albinus* nos tempos de 24 e 48 horas. Os resultados mostraram que os corantes causaram efeitos genotóxicos.

Outras pesquisas com corantes artificiais foram realizadas e confirmados seus efeitos tóxicos em ensaios com ratos, camundongos, culturas celulares e bioensaios vegetais em corantes como azorrubina (AMIN; HAMEID II; ELSTTAR, 2010); amaranto (MPOUNTOUKAS et al. 2010; SARIKAYA; SELVI; ERKOÇ, 2012); ponceau 4R (SHIMADA et al., 2010; HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013); amarelo-sol (DWIVEDI; KUMAR, 2015; DWIVEDI; KUMAR, 2017); azul-brilhante (KUS; EROGLUS, 2015) e verde brilhante (JABEEN et al., 2013; CHEQUER et al., 2017;).

Com relação aos estudos de toxicidade dos corantes inorgânicos, o dióxido de titânio é um dos mais estudados. Segundo Ji; Long; Lin (2011), a forma anatase de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) demonstrou causar prejuízos às

microalgas verdes de água doce, cuja toxicidade variou de acordo com cristalinidade das nanopartículas, resultando na diminuição do crescimento desses organismos.

Resultado semelhante foi relatado por Cardinale, Bier, Kwan (2012) ao avaliarem a toxicidade das nano-TiO<sub>2</sub> para três espécies de microclorofíceas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlamydomonas moewusii*) constatando alterações no metabolismo dessas espécies e diminuição na taxa de crescimento e respiração dessas algas.

Em *A. salina*, os efeitos das nano-TiO<sub>2</sub> mostraram acúmulos significativos dessas partículas no intestino de náuplios. Em concentrações acima de CL50 > 100 mg L<sup>-1</sup> e maior tempo de exposição, o acúmulo dessas partículas resultou na mortalidade de náuplios e adultos devido a incapacidade de excreção dessa substância (ATES et al., 2013).

Hong et al. (2017a), com base em um estudo detalhado sobre os efeitos tóxicos das nano-TiO<sub>2</sub> em ratos e camundongos por inalação, absorção no fígado, rim, baço, e outros órgãos, os autores concluíram que há evidências suficientes para sugerir que as nano-TiO<sub>2</sub> podem induzir toxicidade em vários órgãos.

Outro estudo de Hong et al. (2017b) os camundongos foram expostos às nano-TiO<sub>2</sub> por 9 meses consecutivos e mostraram uma diminuição do peso corporal dos indivíduos, acúmulo dessa substância no timo, alteração dos componentes sanguíneos e também nos linfócitos.

Dentre os corantes naturais, as investigações com o carmim têm demonstrado potencial efeito tóxico devido a relatos de hipersensibilidade. Em um estudo de 2009, pesquisadores identificaram uma proteína do inseto *Dactylopius coccus*, denominada CC38K, como responsável por causar reações alérgicas (OHGIYA; ARAKAWA; AKIYAMA, 2009). Muitos relatos de doenças respiratórias ocupacionais, por exemplo, rinoconjuntivite, asma e alveolite alérgica extrínseca em pessoas que trabalham em açougues e fábricas de corantes naturais são atribuídos ao carmim (COX et al., 2012).

O carmim foi apontado como possível causador de reações alérgicas por causar vermelhidão na pele, inchaço e outros sintomas em pessoas sensíveis ao corante (SAUVAGE, 2010; GULTEKIN; DOGUC, 2013; GREENHAWT; BALDWIN, 2014; SAMPSON et al., 2014).

Testes de liberação de histamina por leucócitos comprovaram que o carmim é responsável por desencadear o mecanismo alérgico IgE, causado por reações alérgicas derivadas de elementos externos. Um caso de uma mulher de trinta e três anos com manchas vermelhas na pele (urticária), vômitos e dispneia foi reportado e confirmado com base em testes de sensibilidade para o corante (GULTEKIN; DOGUC, 2013).

Também foi confirmado sintomas de anafilaxia, diarreia e pressão arterial baixa após a ingestão de alimentos que continham o carmim. Testes in vitro de ativação de basófilos, que analisa a expressão do marcador de ativação de superfície CD203c foram realizados e os resultados apontaram que dentre os constituintes da bebida, apenas o corante carmim gerou resultados claramente positivos para a sintomatologia (SUGIMOTO et al., 2013).

Além desses, outros casos de alergias foram descritos, monitorados e clinicamente analisados na literatura, os casos de choques anafiláticos graves é um dos principais sintomas que despertam maior preocupação (AGOCS; DELI, 2011; VOLTOLINI et al., 2014, CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

O potencial tóxico do corante caramelo IV também tem sido associado a diversos problemas de saúde. A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (Iarc — International Agency Research Cancer), incluiu o 4-MEI, um componente do corante, na lista de substâncias possivelmente cancerígenas para o grupo humano. (IARC, 2011; IDEC, 2012).

O *Center for Science in the Public Interest* (CSPI), de Washington-DC, testou a quantidade do subproduto 4-MEI do corante caramelo IV, no Canadá, nos Emirados Árabes, no México, no Reino Unido e nos Estados Unidos, ainda foram testadas as bebidas vendidas na China, no Japão, no Quênia e no Brasil. O resultado mostrou que a concentração em microgramas de 4-MEI em cada 355 mililitros do refrigerante foi, dos menores para os maiores índices, 56 na China, 72 no Japão, 145 no Reino Unido, 147 no México, 155 nos Emirados Árabes Unidos, 160 no Canadá, 177 no Quênia e 267 no Brasil (IDEC, 2012). Esse dado é alarmante, pois demonstra que o índice no Brasil chega a ser quase cinco vezes maior que o menor índice e nove vezes maior que o índice diário sugerido pela OMS, que é 29 microgramas.

Esses dados foram oficializados no Brasil pelo Diário Oficial da União, por meio da Portaria Interministerial nº 9, de 7 de outubro de 2014, que publicou a Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos (Linach), como referência para a formulação de políticas públicas (Brasil, 2014).

Bu et al. (2015) investigaram os efeitos do 4-MEI a partir de células-tronco mesenquimais e constataram que o mesmo pode ter efeitos tóxicos nessas células e na progressão do câncer. Isso porque eles observaram a proliferação celular e a migração gênica de citocinas hematopoiéticas e perceberam que o 4-MEI na concentração ( $\geq 150 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) afetou a viabilidade dessas células-tronco.

Norizadeh; Topaktas; Yilmaz (2016) estudaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos do 4-MEI usando um ensaio de aberração cromossômica e índice mitótico em ratos. Esses indivíduos foram tratados com 100, 130 e 160 mg/kg por 12 e 24 h, posteriormente as células da medula óssea foram analisadas e os autores concluíram que o componente testado foi genotóxico e citotóxico para todas as concentrações e tempos de exposição.

Para Feng; Cerniglia; Chen (2012) a utilização de corantes em alimentos continua promovendo uma série de dúvidas referentes a toxicidade e mutagenicidade desses compostos uma vez que há escassez de trabalhos na literatura que avaliem os efeitos tóxicos desses compostos

Em se tratando dos riscos a saúde, essa atenção também é voltada para alimentos destinados aos animais, uma vez que esses aditivos também são de uso regular nas rações. Segundo o Sindicato Nacional dos Coletores e Beneficiadores de Sub Produtos de Origem Animal (SINCOBESP), no Brasil a Indústria Epa Química, localizada em Jundiaí (SP) disponibiliza o corante caramelo das classes I, III e IV para fins de uso em ração animal, sendo que a classe IV é a mais comercializada. A empresa Doce Aroma, localizada em Guarulhos (SP) comercializa o corante Carmim de Cochonilha (obtido a partir da secreção do inseto Cochonilha) para o mesmo fim, além de corantes artificiais. (SINCOBESP, 2013).

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (2016), no ano de 2015 foram utilizados mais de 300 000t de aditivos para fabricação de rações para animais. Embora os dados não sejam muito específicos quanto aos percentuais de cada classe de aditivo, os corantes apresentam-se como aqueles que são utilizados regularmente,

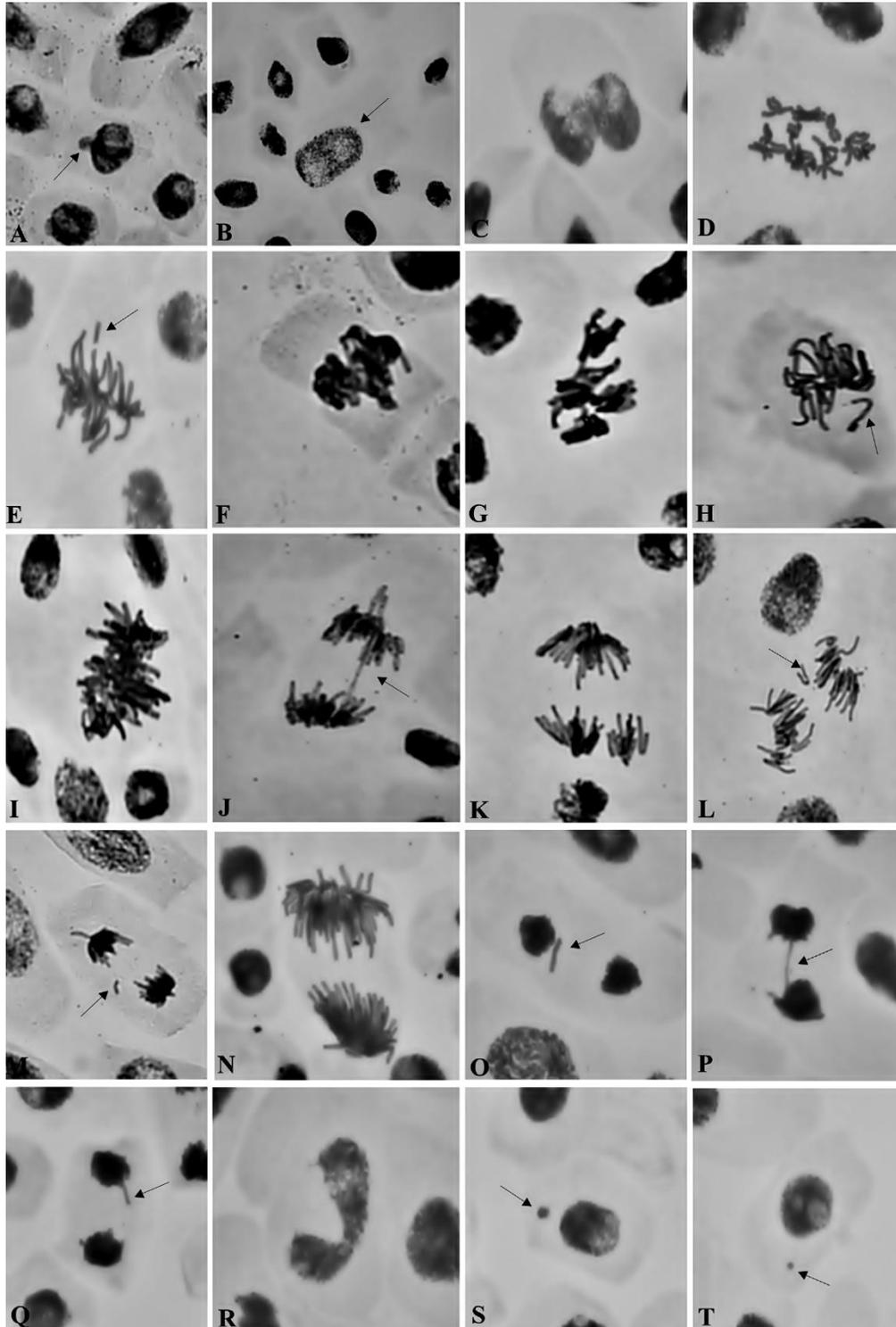
o que reitera a importância de uma legislação mais específica quanto aos limites de uso dessas substâncias para os animais.

Assim, de acordo com Rutkunas; Sabaliauskas; Mizutani (2010), a ação desses aditivos, a nível celular, deve ser avaliada em vários organismos testes, como mamíferos, plantas, insetos e em culturas celulares a fim de que se estabeleça com precisão o real risco desses compostos para a saúde humana e animal.

## 2.7 Sistema teste *Allium cepa* L.

O sistema teste *A. cepa* tem se mostrado eficiente para avaliação e monitoramento de substâncias tóxicas em nível celular (CÂNDIDO et al., 2010). Isso se deve principalmente as suas características cinéticas de rápida proliferação, número cromossômico reduzido ( $2n=16$ ), cromossomos grandes, ao rápido crescimento de suas raízes e tolerância a diferentes condições de cultivo (CARITÁ, 2010; PERON et. al., 2009, HERRERO et al., 2012)

Através desse bioensaio é possível avaliar substâncias em nível celular tendo como parâmetro a citotoxicidade (IM), em função da inibição ou proliferação celular excessiva e a genotoxicidade (IAC), por meio das alterações cromossômicas de origem clastogênicas (quebras cromossômicas) e/ou aneugênica (alterações de fuso mitótico) (MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011; BARBÉRIO; VOLTOLINI; MELLO, 2011) (Figura 1).



**FIGURA 1.** Aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*. (A) Broto nuclear (B) Prófase poliplóide (C) Célula binucleada (D) C-metáfase (E) Metáfase com quebra cromossômica (F-G) Aderências cromossômicas (H) Metáfase com perda cromossômica (I) Metáfase poliplóide (J) Anáfase com ponte cromossômica (K) Anáfase multipolar (L) Anáfase com perda cromossômica (M) Anáfase com quebra cromossômica (N) Anáfase poliplóide (O) Telófase com perda cromossômica (P) Telófase com ponte (Q) Telófase com atraso (R) Núcleo lobulado (S-T) Micronúcleo. Adaptado de: BIANCHI; FERNANDES; MARIN-MORALES; 2016.

São considerados como indicadores de ação clastogênica, as pontes e quebras cromossômicas que, antes da migração total de cromossomos para os polos da célula, dão início à formação do envelope nuclear, resultando na origem de brotos nucleares na tentativa de incorporação dos cromossomos (MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011; BARBÉRIO; VOLTOLINI; MELLO, 2011). As alterações de origem aneugênica são caracterizadas por perdas, atrasos, C-metáfases, aderência e multipolaridade dos cromossomos causados por substâncias tóxicas. Os micronúcleos podem ser resultantes de ambas (BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015).

A espécie *A. cepa* é amplamente citada na literatura como organismo teste para ensaios vegetais e é considerado eficiente para avaliação da citogenotoxicidade fornecendo valiosas informações em relação a avaliação de amostras ambientais, de produtos químicos, extratos de plantas, resíduos industriais e águas contaminadas (CUCHIARA et al., 2012; OLIVEIRA; SANTOS; BOEIRA, 2012; LACERDA; MALAQUIAS; PERON, 2014; SILVA et al., 2015a, b; BIANCHI, MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015, NEVES et al., 2016).

Adicionalmente, o teste *A. cepa* pode ser realizado individualmente (BRAGA; LOPES, 2015) ou em conjunto com outros sistemas testes (AGUIAR et al., 2015; GERAS'KIN et al., 2011), apresentando resultados similares e até complementares quando comparados com outros bioensaios utilizando animais e culturas celulares (TEDESCO; LAUGHINHOUSE IV, 2012; ZENKNER et al., 2014;), como tem sido feito, por exemplo, para avaliação da contaminação de águas superficiais por esgotos, lodos de esgotos domésticos e industriais, poluentes derivados de plantações agrícolas e em extratos aquosos de solos (OLIVEIRA; SANTOS; BOEIRA, 2012; MAZZEO, 2013; MAZZEO, 2015; MARTINS; SOUZA; SOUZA, 2016).

Esse ensaio também foi eficiente na análise de extratos de plantas e infusões, como em *Derris rariflora*, apresentando alto índice de alterações mutagênicas (POLETTTO et al., 2011), *Agaricus blazei*, cujo efeito resultou em redução significativa do índice mitótico (SILVA; BOHM, 2012), e com Pinhão-Roxo *Jatropha gossypifolia*, causando toxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade (ALMEIDA, 2014).

Com relação ao uso desse teste para avaliação da toxicidade de aditivos alimentares podem ser citados os estudos com os corantes amarelo-sol (E-110),

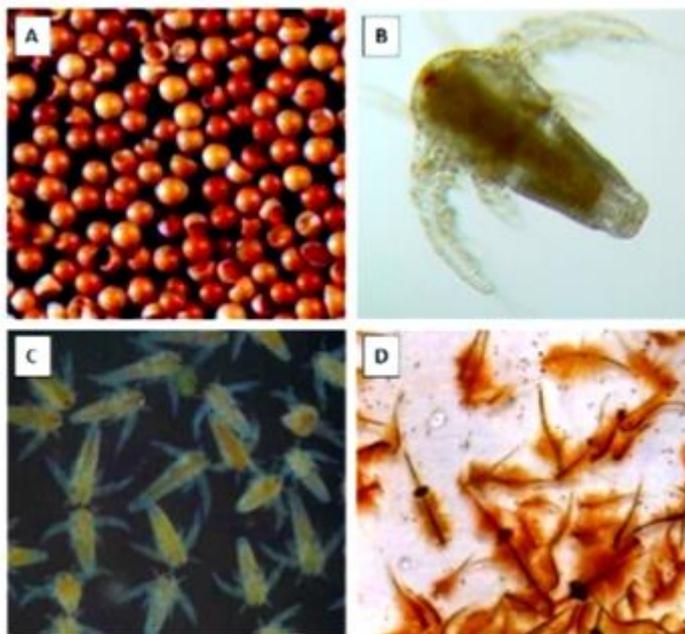
vermelho bordeaux (E-123), amarelo tartrazina (E-102) (GOMES et al. 2013), eritrosina (E-127), azul brilhante (E-133) e vermelho 40 (E-129) (OLIVEIRA et al., 2013), em que ambos apresentaram efeitos citotóxicos e mutagênicos. Para flavorizantes, uma outra categoria de aditivo, um estudo de Marques et al. (2015), demonstraram efeito genotóxico e citotóxico de aromas de morango, leite condensado e chocolate através do mesmo sistema teste.

Além do teste *A. cepa*, outros organismos são utilizados como biomarcadores em ensaios para avaliar aspectos relacionados ao potencial tóxico, mutagênico e citotóxico de diversos produtos.

## 2.8 Sistema teste *Artemia Salina* L

Outro ensaio biológico que pode ser aplicado para a avaliação da toxicidade de compostos é o teste com *A. salina* (GRAMMOU et al., 2011), que pode ser utilizado de maneira isolada ou combinado com outros bioensaios em estudos mais amplos para avaliação de toxicidade (RAJABI et al., 2015).

*A. salina* trata-se de um microcrustáceo (zooplâncton) que é usado para alimentar peixes larvais por aquicultores e foi reconhecido como um modelo biológico adequado em ecotoxicologia (KUMAR et al., 2017; PÉREZ; GILLING, 2010) e nanoecotoxicologia (LIBRALATO, 2014). Detalhes quanto a morfologia do microcrustáceo em diferentes fases (cisto, náuplio, adulto) durante seu ciclo de vida podem ser observados na Figura 2



**FIGURA 2.** Morfologia do micrústáceo *A. salina* Leach nos diferentes estágios do ciclo de vida. A- Detalhes dos cistos. B e C - náuplios da *A. salina*. D - Animal adulto. Fonte: SEYFRIED, 2017

Esse bioensaio é considerado um método simples, barato e eficiente para a determinação de toxicidade aguda de extratos e substâncias (SANTOS; DAVID; DAVID, 2017), a aquisição desse material biológico por meio de cistos dormentes que podem ser armazenados por um longo período de tempo sem perder a viabilidade, é uma das principais vantagens na utilização desse organismo em testes de toxicidade (SILVA et al., 2015a).

O bioensaio utiliza a CL50 (concentração letal 50%) como parâmetro para avaliação da atividade biológica, sendo essa uma forma de prever a toxicidade oral de compostos bioativos, assim como pode indicar prováveis indução para atividade biológica, inseticida, tumoral e cancerígena (ROSA et al., 2016)

Sobre a utilização desse teste em estudos relacionados a aditivos alimentares, Vakili-saatloo et al. (2015) utilizaram as larvas de *A. salina* para avaliar a toxicidade dos corantes azorrubina, amarelo sol e azul brilhante em combinação com o aspartame, aditivo alimentar utilizado para substituir o açúcar comum. Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (10-30nm) também foram investigados utilizando esse organismo (ATES et al., 2013). Johnson et al. (2017) analisaram as influências da morfologia dos cristais quanto as propriedades físico-químicas e tóxicológicas do dióxido de titânio em nanoescala pelo mesmo sistema teste.

Dessa maneira, trata-se de um bioensaio eficiente para avaliação de produtos industrializados e como teste complementar em estudos amplos, sendo uma alternativa interessante em detrimento de outras metodologias mais caras.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos corantes e determinação das concentrações para avaliação de toxicidade em *Allium cepa*

Os corantes alimentares foram adquiridos de uma indústria de fabricação de aditivos alimentares localizada na cidade de São Paulo (SP), Brasil, especializada na comercialização desses produtos.

Porém, antes da aquisição foi realizada uma busca detalhada sobre as formas de uso dos produtos. Principalmente para o corante caramelo IV e carmim, pois nenhuma das empresas pesquisadas dispunham de uma quantidade específica para uso no rótulo. Quando questionados, todos os fabricantes indicaram o uso pela conveniência em relação a cor desejada.

Portanto, para a definição das concentrações em *A. cepa*, realizou-se testes preliminares com o intuito de se chegar em uma concentração máxima tolerada pelo organismo teste, sendo 40 mL/1000 mL (corante/água destilada) para o caramelo IV e 10 mL/0,625 mL (corante/água destilada) para o carmim. Outras quatro concentrações foram estabelecidas com base nessas máximas, sendo 30; 20; 10 e 1 mL/1000 mL para o caramelo IV e 10 mL/ 10; 5; 2,5 e 1,25 mL para o carmim. As concentrações para o dióxido de titânio foram baseadas nas instruções do rótulo, assim foi estabelecida uma concentração máxima de 400 g/1000 mL (corante/água destilada) e a partir dessa se estabeleceu outras quatro, que foram 300, 200, 100, 50 e 25 g/1000 mL.

#### 3.2 Teste *Allium cepa* L.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa 1 do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, da Universidade Federal do Piauí, localizado na cidade de Picos-PI no período de Março a Setembro de 2017. Parte da análise das lâminas aconteceu no Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais localizado no campus Ministro Petrônio Portela, localizado na cidade de Teresina-PI.

Os produtos foram testados em cinco concentrações, onde foram preparadas três lâminas para cada tempo de exposição T1 (0h) T2 (24h) e T3 (48h).

Para a realização deste estudo foram adquiridas cebolas (*A. cepa*) comercialmente e estas foram colocadas para enraizar em frascos com água destilada à temperatura ambiente (25 °C) até se obter raízes com aproximadamente 1,5 cm de comprimento. Antes dos tratamentos, foram retiradas algumas raízes para servir de controle do próprio bulbo (0h). Por conseguinte, as demais foram expostas nas soluções preparadas até o período de 24 h. Passado esse período, algumas raízes de cada bulbo foram novamente retiradas, lavadas e fixadas em Canoy 3:1 (etanol: ácido acético) e em seguida os bulbos novamente foram expostos por mais 24 horas nos tratamentos (48 horas). Após esse período, o restante das raízes foram retiradas e fixadas sob as mesmas condições a -4 °C por 24 horas

Para o preparo das lâminas os meristemas radiculares das amostras foram lavados em água destilada com auxílio de uma pipeta e placa de Petri onde foram feitas três trocas de água. Em seguida, as radículas foram secas em papel absorvente e hidrolisadas em HCl 1N a 60°C durante 10 minutos. Após isso, as raízes foram novamente lavadas com água destilada.

A montagem das lâminas foi feita segundo a técnica de Guerra e Sousa (2002), onde as radículas foram colocadas sobre uma lâmina e com o auxílio de uma lupa e seringas, a coifa de pelo menos três raízes de cada bulbo foi seccionada, sendo descartado o material restante. Foi acrescentada uma gota do coranteorceína a 2% e colocada uma lamínula sobre o material e através de um bastão de vidro iniciou-se o esmagamento, retirando-se o excesso do corante com papel filtro. Após esse processo, as lamínulas foram seladas com esmalte incolor.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para cada bulbo analisou-se 1.000 células, totalizando assim 3.000 para cada grupo controle (0h), e grupo tempo de exposição de 24 e 48h. A citotoxicidade foi determinada pelo cálculo do índice mitótico (IM), e a genotoxicidade pelo índice de alterações cromossômicas (IAC).

O potencial citotóxico foi determinado pelo índice mitótico (IM), na eq. ((1)):

$$(1) \quad IM = \frac{\text{Total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

O potencial genotóxico foi determinado pelo índice de alterações cromossômicas (IAC), na eq. ((2)):

$$(2) \quad IAC = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

Dessa maneira, o parâmetro para determinação de citogenotoxicidade baseou-se em valores que diferiram significativamente do controle.

### 3.3 Determinação das concentrações para avaliação de toxicidade em *Artemia salina*

Para *A. salina* uma série de diluições foram preparadas utilizando os mesmos critérios em *A. cepa*, a partir de uma análise prévia de toxicidade onde buscou-se estabelecer diluições onde foram observadas todas as larvas mortas (máximas) e todas as larvas vivas (mínimas). As concentrações utilizadas podem ser vistas no Quadro 3.

**QUADRO 3.** Diluições dos corantes utilizadas no bioensaio com *Artemia salina*.

|                        | <b>Dióxido de titânio</b> | <b>Carmim</b> | <b>Caramelo</b> |
|------------------------|---------------------------|---------------|-----------------|
|                        | 125.000                   | 125.000       | 7.812,50        |
|                        | 62.500                    | 62.500        | 3.906,25        |
|                        | 31.250                    | 31.250        | 1.963,13        |
|                        | 15.625                    | 15.625        | 976,56          |
| <b>Diluições (ppm)</b> | 7.812,50                  | 7.812,50      | 488,28          |
|                        | 3.906,25                  | 3.906,25      | 244,14          |
|                        | 1.963,13                  | 1.963,13      | 122,07          |
|                        | 976,56                    | 976,56        | 61,04           |
|                        | 488,28                    | 488,28        |                 |
|                        | 244,14                    | 244,14        |                 |
|                        | 122,07                    | 122,07        |                 |

Fonte: Do autor

### 3.4 Teste *Artemia salina* L.

A metodologia utilizada neste bioensaio seguiu o protocolo descrito por Meyer et al. (1982) com modificações em que os cistos de *A. salina* foram colocados para

eclodir em um aquário com água do mar sob condições de aeração e temperatura controlada (20-30 °C) a fim de promover a liberação dos náuplios até o período de 48 horas. Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz e pipetados para uma placa de petri onde foi feita a contagem de dez larvas transferindo-as para os tubos de ensaios com as concentrações (quadro 3) em triplicata.

Assim, foram feitas diluições de forma seriada (3 ml da solução testada) e transferidos os náuplios, os fracos foram dispostos em fileiras em uma bandeja (cada fileira com as três repetições para cada diluição). Os mesmos cuidados durante o período de eclosão foram tomados, como controle de luminosidade, temperatura e proteção contra insetos e poeira. O controle negativo foi feito com solução salina.

Nos tempos de 24 h e 48 h foram realizadas leituras com o auxílio de uma lupa controlando-se as condições de luminosidade, foco e colocando fundo escuro para promover o contraste e facilitar a leitura. Essa etapa considerou as seguintes variáveis para a análise das A.s: Vivas com duas asas/ vivas com 0 asas/ vivas com uma asa/ mortas com 2 asas/ mortas com 1 asa/ mortas com 0 asas. Essa leitura foi realizada de forma minuciosa e levou em consideração aspectos relacionados a mobilidade do microcrustáceo durante aproximadamente uns 10 segundos de observação agitando-se levemente a solução a fim de confirmar o resultado observado.

### 3.5 Análises estatísticas

Após a obtenção dos resultados foi realizada a análise estatística de citotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa* através do software R considerando o nível de significância de 5% utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori. Para *A. salina*, a avaliação da toxicidade foi realizada pelo método de regressão linear com  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados na Tabela 01, verifica-se que os índices mitóticos obtidos para os tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos as concentrações do corante dióxido de titânio, em 24 e 48 horas de exposição, causaram redução significativa da divisão celular quando confrontados aos valores de índices mitóticos observados para os seus respectivos controles. No

entanto, o índice de divisão celular dos tempos de análises 24 e 48 horas das concentrações 25; 50 e 100 g/1000 mL não diferiram significativamente entre si.

**Tabela 1** – Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo.

|                    |       | TE/IM(%)          |                   |                   |                                 |  |
|--------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|--|
| Corante            | TR    | 0 h               | 24 h              | 48 h              | MMS<br>(4 x 10 <sup>-4</sup> M) |  |
| Dióxido de titânio | 25    | 57,0 <sup>a</sup> | 11,7 <sup>b</sup> | 13,7 <sup>b</sup> | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 50    | 70,9 <sup>a</sup> | 14,7 <sup>b</sup> | 19,2 <sup>b</sup> | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 100   | 68,7 <sup>a</sup> | 52,7 <sup>b</sup> | 37,7 <sup>b</sup> | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 200   | 68,7 <sup>a</sup> | 42,7 <sup>b</sup> | 16,9 <sup>c</sup> | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 400   | 57,5 <sup>a</sup> | 32,6 <sup>b</sup> | 17,3 <sup>c</sup> | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
| Carmim             | 10    | 19,8 <sup>a</sup> | 2,6 <sup>b</sup>  | 2,3 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 5     | 51,3 <sup>a</sup> | 2,3 <sup>b</sup>  | 2,4 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 2,5   | 62,3 <sup>a</sup> | 3,5 <sup>b</sup>  | 1,3 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 1,25  | 76,3 <sup>a</sup> | 5,4 <sup>b</sup>  | 1,0 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 0,625 | 68,9 <sup>a</sup> | 7,1 <sup>b</sup>  | 2,1 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
| Caramelo           | 1     | 70,9 <sup>a</sup> | 10,3 <sup>b</sup> | 8,8 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 10    | 27,3 <sup>a</sup> | 13,0 <sup>b</sup> | 9,4 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 20    | 86,0 <sup>a</sup> | 5,2 <sup>b</sup>  | 3,9 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 30    | 72,6 <sup>a</sup> | 10,7 <sup>b</sup> | 8,1 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |
|                    | 40    | 87,4 <sup>a</sup> | 4,8 <sup>b</sup>  | 2,7 <sup>b</sup>  | 7,68 <sup>d</sup>               |  |

TE: tempo de exposição; IM: índice mitótico; TR: tratamento; h: hora. MMS: metil metano sulfonato. Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori ( $p < 0,05$ ; letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes em relação aos tempos de exposição (0, 24 e 48 horas). O parâmetro comparativo refere-se aos corantes individualmente dentro de uma mesma concentração nos diferentes tempos de exposição.

Porém, nas maiores concentrações (200 e 400 g/1000 mL) o declínio desse índice é significativo quanto confrontados aos valores do controle negativo e também em comparação ao tempo de análise de 24 horas. Tal resultado se deu em razão das células estacionarem na etapa anterior a fase M do ciclo celular, o que causou uma redução no índice de divisão pela interferência do corante.

Conforme citado por Herrero et al. (2012), índices mitóticos significativamente inferiores aos índices dos controles - como os observados no presente estudo para os corantes de dióxido de titânio, carmim e caramelo - indicam a presença de agentes cuja ação tóxica compromete o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos. Ademais, esses autores citam que a inibição da proliferação celular

desencadeada por compostos citotóxicos em tecidos de intensa proliferação celular e com desempenho normal, como os utilizados nesta pesquisa, é bastante prejudicial ao organismo por inibir ou limitar a reposição de células, alterar a produção de proteínas e resultar no mal funcionamento do órgão onde está localizada. Tais prejuízos, segundo Valavanidis et al. (2013) e Zilifdar et al. (2014), podem comprometer significativamente a divisão celular do tecido ou órgão afetados.

Para Peron, Canesin e Cardoso (2009), quaisquer modificações no índice de divisão celular e/ou na estrutura do DNA são prejudiciais às células, pois podem prejudicar processos vitais, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica que podem resultar em processos cancerosos ou mesmo morte celular.

Resultados similares ao desta pesquisa foram encontrados na literatura com o uso de outros organismos e culturas celulares. Por exemplo, o dióxido de titânio foi estudado em camundongos (HONG et al., 2017a) e microalgas (MILLER et al., 2012; JI; LONG; LIN, 2011) apresentando efeitos tóxicos.

O  $\text{TiO}_2$  em nanoescala tem sido reportado pela capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e causar estresse metabólico em ambientes intracelulares, além de apresentar potencial risco carcinogênico (HORIE et al., 2010; HUANG et al., 2009; HUSSAIN et al., 2010; RAMKUMAR et al., 2012; ZHAO et al., 2009; ZUCKER et al., 2010). Com relação ao estresse metabólico causado em células pela presença dessas ROS, a danificação de membranas celulares é um dos principais problemas associados, uma vez que facilita a entrada de  $\text{TiO}_2$  no pulmão, onde tem demonstrado causar inflamação crônica e asma (OSMAN; JACOB; ANDERSON, 2011; ROSSI et al., 2010).

Em um estudo recente para analisar as respostas do E171 em fibroblasto de pulmão humano, linhagem WI-38, utilizando o ensaio de viabilidade celular (MTT), morfologia celular, ensaio de potencial de membrana mitocondrial, medição de ROS e análise do ciclo celular, observou-se que as nanopartículas presentes no corante causaram a geração de ROS e manifestações subsequentes que implicam em uma variedade de doenças complexas, como respiratórias e/ou distúrbios inflamatórios (asma), distúrbios neurológicos, envelhecimento e câncer. Com esse trabalho concluiu-se que o dióxido de titânio de grau alimentício apresenta riscos potenciais para a saúde daqueles que o consomem (PERIASAMY et al., 2015)

Apesar dos resultados dessas pesquisas apontarem potencial efeito tóxico deste componente, a legislação atual em matéria de segurança alimentar para o E171 não especifica adequadamente a dimensão do tamanho de partícula  $\text{TiO}_2$ , forma, área de superfície, apesar do crescente debate sobre o impacto dessas partículas em nanoescala sobre a saúde humana e animal (HACKENBERG et al., 2010; TEOW et al., 2011; YU; LI, 2011).

Em relação aditivo carmim e caramelo, as cinco concentrações avaliadas destes corantes no presente estudo (Tabela 1), também induziram significativa inibição da divisão celular logo nas 24 horas de exposição, condição que se manteve para todas as concentrações no tempo de análise 48 horas. Com base nos resultados observados, os corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo foram amplamente citotóxicos as células meristemáticas de *A. cepa*.

Diferentemente, os três aditivos, nas condições de análises estabelecidas, não induziram neste sistema teste a formação de alterações celulares em número significativo, mostrando-se não genotóxicos (Tabela 2).

**Tabela 2** – Índices de alterações cromossômicas observadas em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos corantes Dióxido de titânio, carmim e caramelo.

| Corante            | TR    | TE/IAC(%)         |                   |                   | MMS<br>(4 x 10 <sup>-4</sup> M) |
|--------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|
|                    |       | 0 h               | 24 h              | 48 h              |                                 |
| Dióxido de titânio | 25    | 0,00 <sup>a</sup> | 0,13 <sup>a</sup> | 0,66 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 50    | 0,00 <sup>a</sup> | 1,26 <sup>a</sup> | 1,56 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 100   | 0,00 <sup>a</sup> | 0,63 <sup>a</sup> | 0,86 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 200   | 0,00 <sup>a</sup> | 0,66 <sup>a</sup> | 0,63 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 400   | 0,00 <sup>a</sup> | 1,5 <sup>a</sup>  | 1 <sup>a</sup>    | 2,95 <sup>d</sup>               |
| Carmim             | 10    | 0,03 <sup>a</sup> | 0,15 <sup>a</sup> | 0,03 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 5     | 0,00 <sup>a</sup> | 0,2 <sup>a</sup>  | 0,17 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 2,5   | 0,02 <sup>a</sup> | 0,06 <sup>a</sup> | 0,32 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 1,25  | 0,00 <sup>a</sup> | 0,00 <sup>a</sup> | 0,28 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 0,625 | 0,00 <sup>a</sup> | 0,3 <sup>a</sup>  | 0,08 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
| Caramelo           | 1     | 0,00 <sup>a</sup> | 0,23 <sup>a</sup> | 0,7 <sup>a</sup>  | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 10    | 0,00 <sup>a</sup> | 0,00 <sup>a</sup> | 0,86 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 20    | 0,00 <sup>a</sup> | 0,3 <sup>a</sup>  | 0,28 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 30    | 0,00 <sup>a</sup> | 0,36 <sup>a</sup> | 0,63 <sup>a</sup> | 2,95 <sup>d</sup>               |
|                    | 40    | 0,00 <sup>a</sup> | 0,26 <sup>a</sup> | 0,6 <sup>a</sup>  | 2,95 <sup>d</sup>               |

TE: tempo de exposição; IAC: índice de alterações cromossômicas; TR: tratamento; h: hora. MMS: metil metano sulfonato. Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori ( $p < 0,05$ ; letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes em relação ao controle). O parâmetro comparativo refere-se aos corantes individualmente dentro de uma mesma concentração nos diferentes tempos de exposição.

Dessa maneira, esses resultados se relacionam com o resultado de citotoxicidade apresentado na tabela 1, pois à medida em que a taxa de divisão é reduzida, conseqüentemente menos células entrarão em divisão e menos alterações celulares serão percebidas. Sales et al. (2016) ressaltam que a inibição da divisão em tecidos normais pode ocorrer pela ação de agentes que afetam a integridade do fuso nuclear durante a mitose promovendo significativo desarranjo cromossômico. Ao considerar que o princípio do ciclo celular é a formação de células idênticas, a produção de novas células com alteração significativa na estrutura e/ou no número cromossômico tornam o funcionamento celular inviável e tendem a ser eliminadas de tecidos com desempenho normal, o que pode acarretar efeito antiproliferativo significativo.

Esses resultados são importantes principalmente em relação ao corante

carmim, tendo em vista que não foram encontrados registros de estudos com ensaios toxicológicos. Sendo assim, as discussões voltadas para os efeitos tóxicos desses produtos têm sido associadas por ser a causa de reações alérgicas em pessoas sensíveis (GULTEKIN; DOGUC, 2013; COX et al., 2012).

Entre essas reações, a literatura apresenta principalmente: asma ocupacional (LIZASO et al., 2000; FERRER et al., 2005; BEAUDOUIN et al., 1995), rinoconjuntivite (ACERO et al. 1998; FERRER et al., 2005), urticária (KOTOBUKI et al., 2007; ZENAIKI et al., 2005), asma (GREENHAWT; BALDWIN, 2008), anafilaxia (GREENHAWT; BALDWIN, 2008; YAMAKAWA et al., 2009; WUTHRICH; KAGI; STUCKER, 1997; GREENHAWT; MCMORRIS; BALDWIN, 2009; CHUNG et al., 2001) e dermatite de contato (SHAW, 2009) como os sintomas mais comuns.

Assim, torna-se evidente a importância desta pesquisa visto que os resultados obtidos em *A. cepa* são excelentes parâmetros de análise citotóxica e que as observações das alterações no ciclo celular dessa espécie têm sido úteis como indicador para alertar as pessoas sobre o consumo de certos alimentos (LERDA et al., 2010).

Diferente do carmim, o corante caramelo IV tem sido avaliado sob diferentes bioensaios sendo evidenciado os efeitos tóxicos do 4-MEI frente a células tronco mesenquimais (BU et al., 2015) e em camundongos (NORIZADEH; TOPAKTAS; YILMAZ, 2016; NORIZADEH et al., 2016).

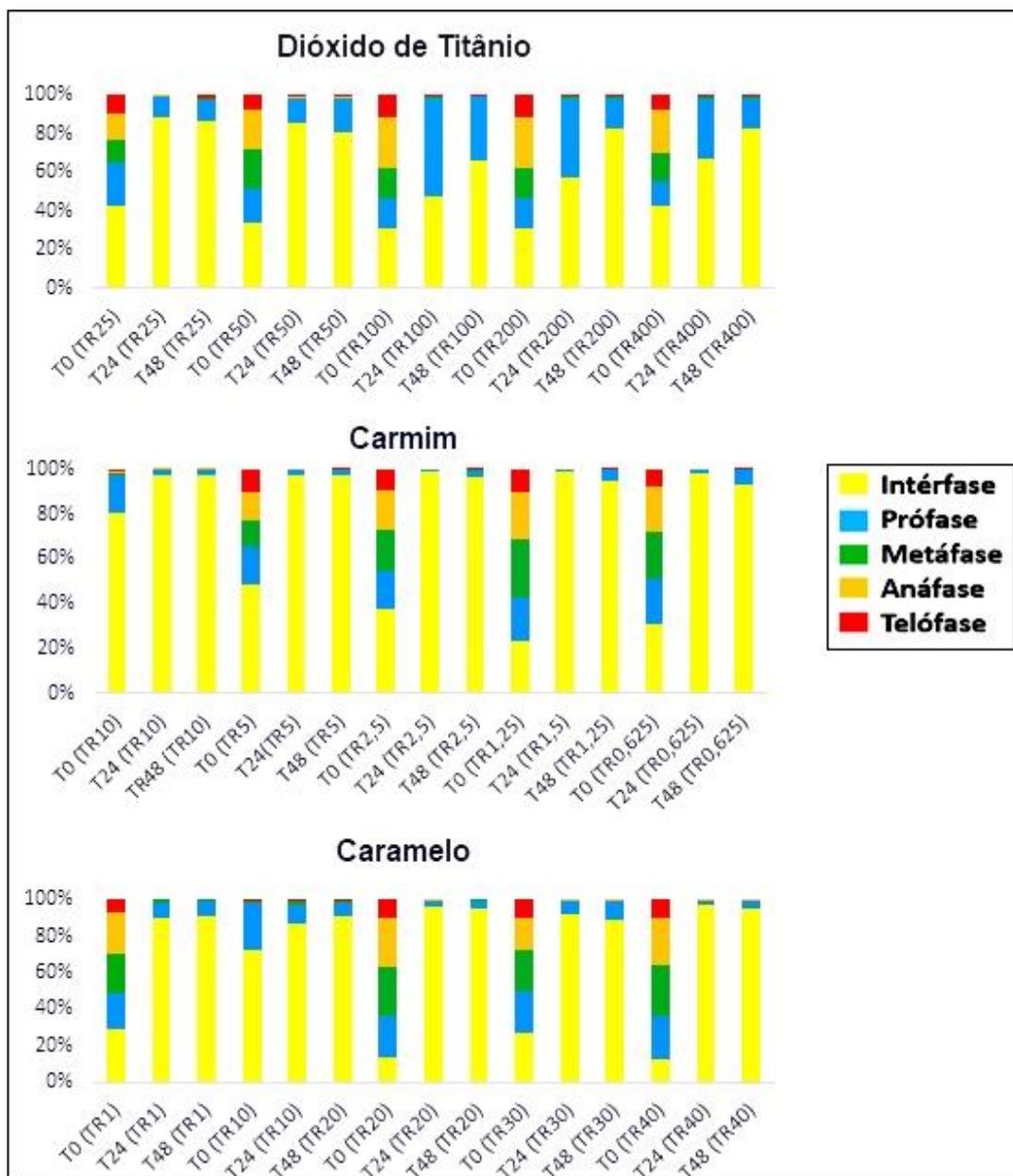
O 4-MEI há muito tempo é conhecido como tóxico para animais (NISHIE; WAISS; KEYL, 1969; 1970), porém na última década o Programa Nacional de Toxicologia (NTP) testou essas substâncias quanto a carcinogênese e outros efeitos crônico através da alimentação de ratos e camundongos.

Em um desses estudos, conduzido com camundongos fêmeas e machos durante 106 semanas, o NTP em 2007 concluiu que houve evidência clara de atividade carcinogênica do 4-MEI em ambos os grupos testados levando em conta o aumento de neoplasias alveolares e bronquiolares (NTP, 2007). Na alimentação de ratas, concluiu-se que houve incidência de células mononucleadas na dosagem de 5000ppm e que houve aumentos significativos de inflamação crônica no pulmão, cardiomiopatia, atrofia focal do pâncreas e aparecimento de nódulos na tireóide dentre

outros agravantes, como hiperatividade, no entanto nenhuma evidência de atividade carcinogênica em ratos machos foi observada. (CHAN et al., 2008)

Em uma pesquisa relacionada a citotoxicidade do 4-MEI, através de injeção intraperitoneal, observou-se redução significativa do IM nas concentrações 160mg/kg após 12 horas e em todas as outras concentrações menores em 24 horas utilizando células da medula óssea em camundongos *Swiss albino* (NORIZADEH; TOPAKTAS; YILMAZ, 2016). Assim, esses resultados, somados aos desta pesquisa são importantes no sentido de alertar sobre a interferência desse corante no metabolismo celular visto que a longo prazo pode interferir potencialmente na morte celular pela expressiva redução do índice mitótico, tal como apontado nesta pesquisa, causando sérios prejuízos aos organismos expostos.

Sobre as análises citotóxicas nos resultados deste trabalho, ressalta-se ainda que a observação do ciclo celular em *A. cepa*, ainda que tenham sido encontradas intérfases em maior número, o que resultou no baixo MI, as poucas divisões subsequentes mantiveram-se na prófase sendo encontrados menores números de células nas demais etapas do ciclo celular, em pelo menos três concentrações de cada corante estudado (figura 3). Segundo Liman et al. (2011) um aumento distinto da porcentagem de prófase e diminuição simultânea de outras fases da mitose pode indicar bloqueio do ponto de checagem (CHFR) no estágio entre prófase/metáfase. Esse CHFR é definido como um ponto de verificação que atrasa a entrada na metáfase em resposta ao estresse mitótico e já foi constatado em outros trabalhos com aditivos alimentares (TÜRKOGLU, 2007, 2008, 2009a, 2009b, 2015).

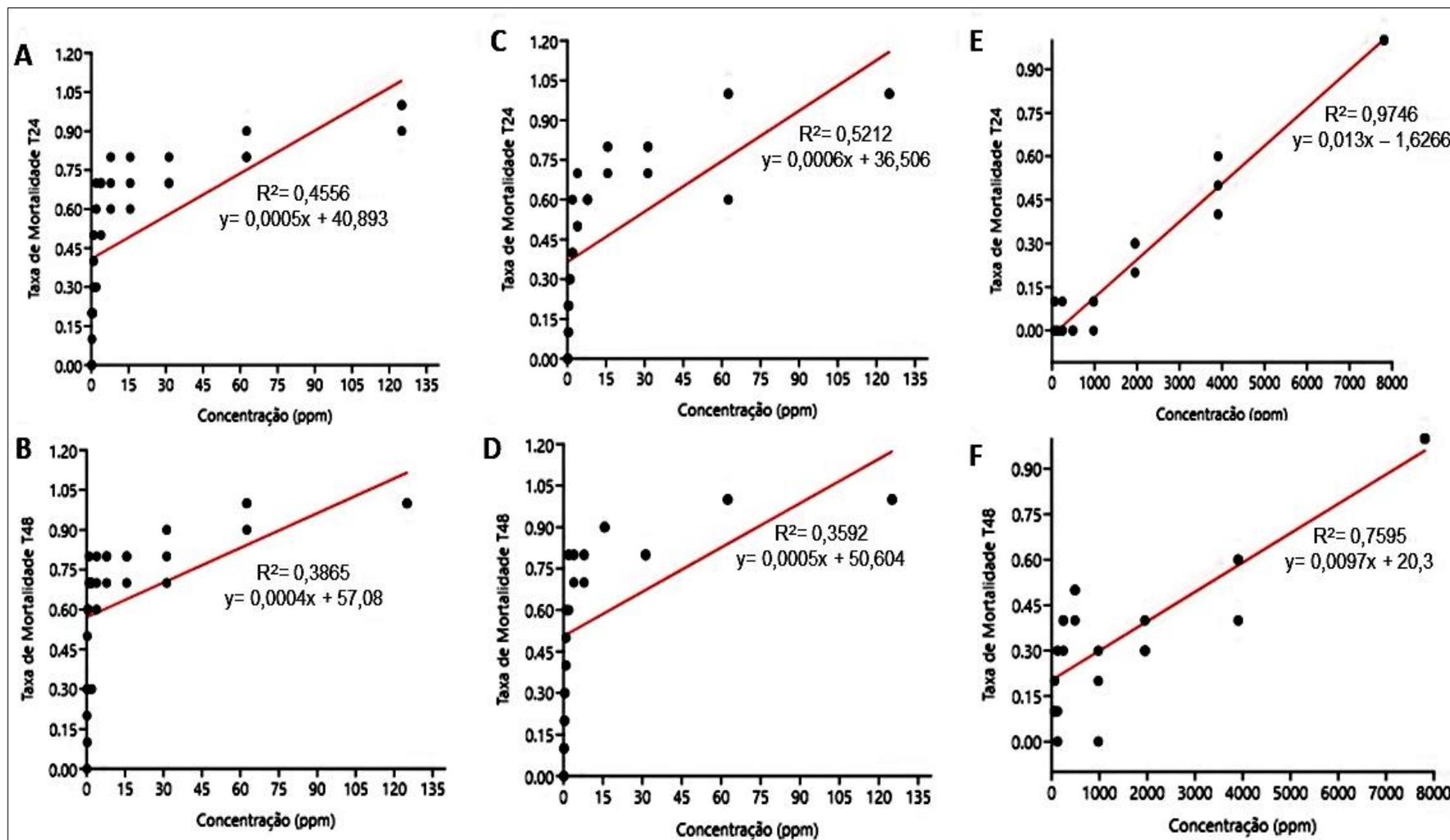


**FIGURA 3.** Percentuais de cada fase de divisão celular em relação aos tempos de exposição e concentrações avaliadas em *A. cepa* para os corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo.

De maneira geral, sabe-se que perturbações no ciclo celular e no material genético podem causar consequências graves e até irreversíveis em organismos vivos. Dessa forma, Ceyhan et al. (2013) enfatizam sobre o risco dos corantes alimentares associando seu uso com distúrbios comportamentais e de desenvolvimento e dificuldade de aprendizagem na infância. Honorato et al. (2013) ressaltam que embora o uso dessa classe de aditivo seja permitido pelo Ministério da saúde, torna-se necessário que sejam feitos mais ensaios para se determinar os efeitos nocivos desses compostos, principalmente no caso dos corantes, que foram apontados como sendo uma das substâncias químicas que mais causam danos no

DNA.

Neste estudo, os corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo também foram avaliados quanto a toxicidade em náuplios de *A. salina*. Com base nos gráficos apresentados na Figura 4, verifica-se que os aditivos, desde as menores concentrações testadas e nas primeiras 24 horas, causaram a mortalidade dos microcrustáceos, elevando essa taxa conforme o tempo de exposição.



**FIGURA 4.** Toxicidade dos corantes dióxido de titânio (A e B), carmim (C e D), e caramelo (E e F) frente ao bioensaio *A. salina* em 24 e 48 horas de exposição.

Esse efeito tóxico também foi intensificado conforme a concentração do corante, sendo mais efetivo nas concentrações maiores atingindo a taxa de 100% de mortalidade. Assim, ainda que neste bioensaio as concentrações utilizadas sejam menores quando comparadas àquelas aplicadas em *A. cepa* neste mesmo estudo, estes aditivos demonstraram grande potencial tóxico frente ao bioensaio em questão, corroborando com os resultados observados neste trabalho para o teste *A. cepa*.

Sobre os estudos de toxicidade para os corantes utilizados neste estudo frente à *A. salina*, somente o dióxido de titânio teve seus efeitos investigados. Ates et al. (2013) demonstraram que as nano-TiO<sub>2</sub> mostraram acúmulos significativos no intestino de náuplios e causou mortalidade devido a incapacidade de excreção dessa substância. Em outro trabalho com o mesmo organismo teste, por meio da incorporação de nano-TiO<sub>2</sub> na dieta e da exposição de náuplios em água contendo o produto, foi constatada a sensibilidade desse organismo ao agente químico uma vez que causou alterações morfológicas deletérias no microcrustáceo (BHUVANESHWARI, 2018). Para os corantes carmim e caramelo, não foram encontrados registros.

No entanto diversos ensaios de toxicidade têm sido realizados testando diferentes substâncias em *A. salina* (FOGUEL, 2010). Para Amarante et al. (2011), esse bioensaio trata-se de um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de compostos sintéticos e produtos naturais. Dessa maneira, apesar de não terem sido encontrados estudos anteriores com os corantes carmim e caramelo com este bioensaio, os resultados observados com o uso de outras metodologias de estudo sobre os efeitos tóxicos desses aditivos, como as que já foram comentadas anteriormente, aliados aos resultados desta pesquisa, servem como um alerta quanto ao efeito tóxico dessas substâncias para humanos e animais.

Essa preocupação ainda é maior quando se constata que a Legislação Brasileira, no tocante ao consumo de alimentos ultraprocessados com adição de corantes no Brasil, é muito mais permissiva que em muitos outros países, tais como a Noruega, Estados Unidos e Áustria (IDEC, 2012)

Em um estudo de Sá et al. (2016) constataram que a diminuição de aditivos na dieta, especialmente daqueles contendo corantes, poderia reduzir sintomas de

transtornos de comportamento em crianças, por exemplo, mas que infelizmente não há políticas sobre a relação da alimentação com alguns problemas de saúde e que a falta de estudos para embasar tais políticas é um fator contribuinte.

Assim, os resultados obtidos nesta pesquisa incluídos aos disponíveis na literatura sobre a toxicidade em nível celular destes três aditivos servem como norteadores aos profissionais da área da saúde e aos comitês responsáveis pelo estabelecimento das IDA para humanos e animais, como por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para delimitação de quantidades ideais de utilização destes aditivos alimentares, bem como estimular a realização de novas pesquisas sobre a avaliação de toxicidade em nível celular do dióxido de titânio, carmim e caramelo.

Ademais, os efeitos sobre o consumo de aditivos corantes não podem mais ser ignorados e o presente estudo pode contribuir para a elaboração de estratégias de vigilância alimentar, pois a qualidade do produto final, envolvendo características e quantidade de todos os ingredientes, sejam eles naturais ou artificiais, utilizados na formulação de um alimento, é uma forma de garantir a segurança dos produtos e da saúde dos seres vivos.

## **5. CONCLUSÕES**

Assim, as análises realizadas neste trabalho confirmam o efeito tóxico dos corantes dióxido de titânio, carmim e caramelo sobre os sistemas testes avaliados demonstrando a necessidade de controle no uso desses aditivos pelas principais agências reguladoras responsáveis pelo Índice de Ingestão Diária (IDA), como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura Nações/Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS), o Comitê Internacional de Cientistas Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (JECFA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sobre o estabelecimento de limites toleráveis apropriados no uso desses aditivos em alimentos. Porém, ressalta-se ainda a necessidade de estudos adicionais com outros ensaios de toxicidade em animais, outros sistemas testes e culturas celulares, visto que os registros encontrados de estudos voltados para a toxicologia dos corantes abordados nesta pesquisa são escassos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES. **Mercado de refrigerantes**, 2011. Disponível em: <<https://abir.org.br/downloads/2008/pt1.pdf>>. Acesso em: 8 Mai. 2018.
- ACERO, S.; TABAR, A. I.; ALVAREZ, M. J.; GARCIA, B. E.; OLAGUIBEL, J. M.; MONEO, I. Occupational asthma and Food allergy due to carmine: Case report. **Allergy**, v. 53, p. 897-901, 1998.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resoluções nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol-/index\99.htm>>. Acesso em: 10 Mai. 2018.
- AGOCS, A.; DELI, J. Pigments in your food. **J. Food Compost. Anal.** v. 24, n. 6, 757–759, 2011.
- AGUIAR, A. R.; AGUIAR, D.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F. Efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma ssp.* sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de *Allium cepa*. **Biosciences Journal**, v. 31, n. 3, p. 934-940, 2015.
- ALMEIDA, P. G. **Corante Caramelo Utilizado em Refrigerantes: Caracterização Físico-Química e Compostos Voláteis**. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, p. 49, 2011.
- ALMEIDA, P. M. **Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.)**. Tese (doutorado em genética) - Universidade Federal de Pernambuco, p. 113, 2014.
- AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, p.431 –434, 2011.
- AMIN, K. A.; HAMEID, H. A.; ELSTTAR, A. H. A. 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, p. 2994-2999, 2010.
- ARIT, U. **The legislation of food colours in Europe, Boycentown, Carrigaline, County Cork**. NATCOL, 2011.
- ARSLAN, Z. K.; AYCAN, S. An example of the use of spectrophotometric method: determining the carmine in various food products. **Procedia – Social and Behavioral Sciences**, v. 116, p. 4622-4625, 2014.
- ATES, M.; DANIELS, J.; ARSLAN, Z.; FARAH, I. O. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. **Environ. Monit. Assess.**, v. 185, p. 3339–3348, 2013.

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALI L. J.; AGONDI, R. C.; MOTTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 2011.

BAFANA, A.; DEVI, S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. **Environmental Reviews**, Ottawa, v. 19, p. 350-370, 2011.

BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; MELLO, M. L. S. Standardization of bulb and root numbers for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 927-935, 2011.

BEAUDOUIN, E.; KANNY, G.; LAMBERT, H.; FREMONT, S.; MONERET-VAUTRIN, D. A. Food anaphylaxis following ingestion of carmine. **Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, Immunology**, v. 74, n. 5, p. 427-430, 1995.

BEZERRA, M. D. S.; MALAQUIAS, G. D. S.; SOUSA, J. M. D.; PERON, A. P. Cytotoxic and genotoxic potential of powdered juices. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 49-55, 2016.

BHUVANESHWARI, M. Toxicity and trophic transfer of P25 TiO<sub>2</sub> NPs from *Dunaliella salina* to *Artemia salina*: Effect of dietary and waterborne exposure. **Environmental research**, v. 160, p. 39-46, 2018.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathioin on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, n. 1, p. 102-111, 2015.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-483, 2016.

BORGES, M. E.; TEJERA, R. L.; DÍAZ, L.; ESPARZA, P.; IBÁÑEZ, E. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1855-1860, 2012.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Revista Ambiente e Água**, v. 10, n. 1, p. 130-140, 2015.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução-CNNPA nº 44, de 1977**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44\\_77.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm)> Acesso em: 28 Fev. 2018.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resoluções nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999**. 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol-/index\ 99.htm>>. Acesso em: 10 Mai. 2018

BRASIL. **Estabelece critérios e procedimentos para rotulagem e propaganda e para isenção de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia**. Diário Oficial da União, 2009.

BRASIL. **Informe Técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. n. 68, de**

**3 de setembro de 2015.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+68,+de+3+de+setembro+de+2015>>. Acesso em: 7 Jun. 2018.

BRASIL. **Informe Técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. n. 68, de 3 de setembro de 2015.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+68,+de+3+de+setembro+de+2015>>. Acesso em: 7 Jun. 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa n.51, de 29 de dezembro de 2006.** Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus limites em Alimentos 8: Carnes e Produtos Carneos. Brasília, Diário Oficial da União, Seção 1, de 4 de Janeiro de 2007.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004.** D.O.U., Brasília, 01 de dezembro de 2004. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 8 Jun. 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 42, de 16 de Dezembro de 2010.** D.O.U., Brasília, 17 de dezembro de 2010. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Acesso em: 8 Jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 Set. 2002

BRASIL. **Portaria Interministerial n.º 9, de 7 de outubro de 2014.** Publica a Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos (Linach), como referência para formulação de políticas públicas, na forma do anexo a esta Portaria. Seção 1, n. 194, p.140-142. Disponível em: <[http://www.lex.com.br/legis\\_26039849\\_PORTARIA\\_INTERMINISTERIAL\\_N\\_9\\_DE\\_7\\_DE\\_OUTUBRO\\_DE\\_2014.aspx](http://www.lex.com.br/legis_26039849_PORTARIA_INTERMINISTERIAL_N_9_DE_7_DE_OUTUBRO_DE_2014.aspx)>. Acesso em: 29 Mai. 2018.

BRASIL. **Projeto de Lei nº 1.370, de 2011.** Comissão De Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. v. 2012, p. 1–5, 2011. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=502584>>. Acesso em: 21 Abr. 2018.

BRASIL. **Resolução nº 387, de 05 de agosto de 1999 4ªa.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 30 Mai. 2018.

BU, F.; TAO, L.; DING, Y.; SUN, L.; TU, T.; ZHOU, F.; QI, W.; JIANG, X.; FANG, J.; HU, J.; ZHU, W.; SUN, X. Cytotoxic effects of 4-methylimidazole on bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. **Am. J. Transl. Res.** v. 7, n. 10, p. 1736–1746, 2015.

CÂNDIDO, A. C. D. S.; SCHMIDT, V.; LAURA, V. A.; FACCENDA, O.; HESS, S. C.; SIMIONATTO, E.; PERES, M. T. L. P. Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link (Fabaceae, Caesalpinioideae): **Acta Botânica brasileira.** 2010.

CARDINALE, B. J., BIER, R., KWAN, C. Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the growth and metabolism of three species of freshwater algae. **J Nanopart Res.**, v. 14, n. 913, 2012.

CARDOSO, G. H. S.; DANTAS, E. B. S.; SOUSA, F. R. C.; PERON, A. P. Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) in plant test system. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 886-889, 2014.

CARITÁ, R. **Efeito genotóxico e mutagênico de amostras de águas coletadas em rios que recebem efluentes urbanos e industriais de um pólo ceramista por meio do sistema-teste *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - UNESP, Rio Claro, p. 187, 2010.

CAROCHO, M., MORALES, P., FERREIRA, I.C.F.R. Natural food additives: quo vadis? **Trends Food Sci. Technol.**, v. 45, p. 284–295, 2015.

CEYHAN, B.M.; GULTEKIN, F.; DOGUC, D. K.; KULAC, E. Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning and memory in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.56, p.145-148, 2013.

CHAN, P. C.; HILLS, G. D.; KISSLING, G. E.; NYSKA, A. Toxicity and carcinogenicity studies of 4-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. **Archives of toxicology**, v. 82, n. 1, p. 45-53, 2008.

CHEQUER, F. M; VENANCIO, V. P; ALMEIDA, M. R; AISSA, A. F; BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. Genotoxicity Evaluation and Chemical Characterization of Some Synthetic Food Dyes. **Toxicology and industrial health**, v. 33, n. 10, p. 765-774, 2017.

CHUNG, K.; BAKER JR, J. R.; BALDWIN, J. L.; CHOU, A. Identification of carmine allergens among three carmine allergy patients: Case report. **Allergy**, v. 56, p. 73-77, 2001.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L.F. Ecotoxicology Of Nano-TiO<sub>2</sub>, na evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems. **Int. J. Environ. Res.**, v.6, 33-50, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. CODEX general standard for food additives (GSFA) online database. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/en/>>. Acesso em: 23 Mai. 2018.

COIMBRA, M. A.; OLIVEIRA, B. B.; POÇAS, F.; TEIXEIRA, A.; DELGADILLO, I. Aditivos e contaminantes da cadeia alimentar: enquadramento legal, progressos relevantes e riscos emergentes. **Riscos e alimentos**, n. 14, 2017.

COX, C. E.; EBO, D. G. Carmine red (E-120)-induced occupational respiratory allergy in a screen-printing worker: a case report. **B-ENT**. v. 8, p. 229-32. 2012.

CRUZ, N. S.; PEREIRA, M. S. R. SCMIELE, M. TELLES, M. S, ZANIN, C. I. C. B. O efeito do corante caramelo IV em bebidas industrializadas. **Gestão em Foco**, n. 7, 2015.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.6, n.1, p.33-38, 2012.

CUNHA, F. G. **Estudo da Extração Mecânica de Bixina das Sementes de Urucum em Leito de Jorro**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 92, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Artemed, 2010. 900 p.

DWIVEDI, H.; KUMAR, G. Genomic distortion induced by food dyes on meristematic cells of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Ajwain). **Chromosome Botany**, v. 12, n. 3, p. 46-51, 2017.

DWIVEDI, K.; KUMAR, G. Genetic damage induced by a food coloring dye (sunset yellow) on meristematic cells of *Brassica campestris* L. **Journal of environmental and public health**, Cairo, v. 2015, 16 Mar. 2015.

FADEEL, B.; PIETROIUSTI, A.; SHVEDOVA, A. A. **Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health**. Waltham: Academic Press, 2012. 360 p.

FÁVERO, D. M.; RIBEIRO, C. S. G.; AQUINO, A. D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 1, p. 11-20, 2011.

FDA – UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Questions & Answers on Caramel Coloring and 4-MEI. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm364184.htm>>. Acesso em: 22 Abr. 2018

FENG, J.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, H. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 4, p. 568-586, 2012.

FERRER, D.; MARCO, F. M.; ANDREU, C.; SEMPERE, J. M. Occupational asthma to carmine in a butcher. **International archives of allergy and immunology**, v. 138, n. 3, p. 243-250, 2005.

FOGUEL, A. F. Estudo comparativo entre os teores de cafeína presente nos diferentes tipos de cafés industrializados. Araras-SP, 2010.

GERAS'KIN, S.; OUDALOVA, A.; MICHALIK, B.; DIKAREVA, N.; DIKAREV, V. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia postmining areas, Poland by means A. test. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1133-1146, 2011.

GOMES, K. M. S.; OLIVEIRA, M. V. G. A.; CARVALHO, F. R. S.; MENEZES, C. C.; PERON, A. P. Citotoxicity of food dyes sunset (E-110), bourdeaux red (E-123), and tatraze yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.

GOMES, L. M. M. **Inclusão de Carotenoides de Pimentão Vermelho em Ciclodextrinas e Avaliação da Sua Estabilidade, Visando Aplicação em Alimentos**. Dissertação (Mestre em Ciências Aplicadas) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, p. 108, 2012.

GONZÁLEZ, E. A.; GARCÍA, E. M.; NAZARENO, M. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts. **Food Chemistry**, v. 119, p. 358-362, 2010.

GOSETTI, F.; CHIUMINATTO, U.; MAZZUCO, E.; MASTROIANNI, R.; MARENGO, E. Ultra-high-performance liquid chromatography/tandem high-resolution mass spectrometry analysis of sixteen red beverages containing carminic acid: Identification of degradation products by using principal component analysis/discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 454-462, 2015.

GRAMMOU, A.; PAPADIMITRIOU, C.; SAMARAS, P.; VASARA, E.; PAPADOPOULOS, A. I. Effect of municipal waste water effluent upon the expression of Glutathione S-transferase isoenzymes of brine shrimp A.. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 105–109, 2011.

GREENHAWT, M. J.; BALDWIN, J. L. Food colorings and flavors. In: METCALFE, D. D., SAMPSON, H. A., SIMON, R. A. **Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives**, v. 4, Wiley Online Library, 2014, p. 411–436.

GREENHAWT, M.; BALDWIN, J. L. Part 4: Adverse reactions to food additives. Chapter 34: Food colorings and flavors. In: Met-calfe DD, Sampson HA, Simon RA (eds) Food allergy adverse reactions to foods and food additives. **Food Allergy**, p. 403, 2008.

GREENHAWT, M.; MCMORRIS, M.; BALDWIN, J. Carmine hypersensitivity masquerading as azithromycin hypersensitivity. In: **Allergy and asthma proceedings**. p. 95-101, 2009.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. **Funpec**, São Paulo, Brasil. p.131, 2002.

GULTEKIN, F.; DOGUC, D. K. Allergic and immunologic reactions to food additives. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 45, n. 1, p. 6–29, 2013.

GWINN, M. R.; SOKULL-KLUTTGEN, B. Regulation and Legislation In: FADEEL, B.; PIETROIUSTI, A.; SHVEDOVA, A. A. **Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health**. Waltham: Academic Press, 2012. p. 97-117.

HACKENBERG, S.; FRIEHS, G.; FROELICH, K.; GINZKEY, C.; KOEHLER, C.; SCHERZED, A.; BURGHARTZ, M.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. Intracellular distribution, geno-and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. **Toxicology letters**, v. 195, n. 1, p. 9-14, 2010.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M, J. C.; SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor; Substâncias naturais como corantes há indústria alimentícia. **R. Virtual Quim.**, v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

HERRERO, O.; PÉREZ MARTIN, J. M.; FREIRE, P. F.; LÓPEZ, L. C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern

by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1, p. 20-24, 2012.

HONG, F. S.; ZHOU, Y. M.; ZHAO, X.; SHENG, L.; WANG, L. Maternal exposure to nanosized titanium dioxide suppresses embryonic development in mice. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 6197, 2017a.

HONG, F. S.; ZHOU, Y. M.; ZHOU, Y. J.; WANG, L. Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. **Environ Toxicol.**, v. 32, n. 10, p. 2234-2243, 2017b.

HONORATO, C. T.; BATISTA, E.; NASCIMENTO, O. K.; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 1-11, 2013.

HORIE, M.; NISHIO, K.; FUJITA, K.; KATO, H.; ENDOH, S.; SUZUKI, M.; NAKAMURA, A.; MIYAUCHI, A.; KINUGASA, S.; YAMAMOTO, K.; IWAHASHI, H.; MURAYAMA, H.; NIKI, E.; YOSHIDA, Y. Cellular responses by stable and uniform ultrafine titanium dioxide particles in culture-medium dispersions when secondary particle size was 100 nm or less. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1629-1638, 2010.

HUANG, S.; CHUEH, P. J.; LIN, Y. W.; SHIH, T. S.; CHUANG, S. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 241, n. 2, p. 182-194, 2009.

HUSSAIN, S.; THOMASSEN, L.C.; FERECATU, I.; BOROT, M.C.; ANDREAU, K.; MARTENS, J.A.; FLEURY, J.; BAEZA-SQUIBAN, A.; MARANO, F.; BOLAND, S. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 10, 2010.

IARC - Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer. **Organização Mundial da Saúde: Agents Classified by the IARC Monographs**. 2011. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>>. Acesso em: 21 Mai. 2018.

IDEC – INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. Substância presente na Coca-Cola pode causar câncer. 2012. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/consultas/dicas-e-direitos/cuidados-com-os-corantes-dos-alimentos>>. Acesso em: 22 Abr. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA. Estatísticas agrícolas 2015. 2016. Disponível em: <[https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOE\\_Spub\\_boui=271434407&PUBLICACOESmodo=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOE_Spub_boui=271434407&PUBLICACOESmodo=2)>. Acesso em: 15 Jun. 2018.

JABEEN, H. S.; RAHMAN, S.; MAHMOOD, S.; ANWER, S. Genotoxicity Assessment of Amaranth and Allura Red Using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 90, p. 22–26, 2013.

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. WHO Food Additives, Series 59. World

Health Organization, Geneva, 2008.

JI, J.; LONG, Z.; LIN, D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, p. 525–530, 2011.

JOHNSON, M.; ATES, M.; ARSLAN, Z.; FARAH, I.; BOGATU, C. Assessment of Crystal Morphology on Uptake, Particle Dissolution, and Toxicity of Nanoscale Titanium Dioxide on *Artemia salina*. **Journal of nanotoxicology and nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 11, 2017.

KHODARAHMI, R.; ASHRAFI-KOOSHK, M. R.; KHALEDIAN, K. Allura Red, the artificial azo dye, inhibits esterase activity of carbonic anhydrase II: a preliminary study on the food safety in term of enzyme inhibition. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 43-52, 2015.

KOTOBUKI, Y.; AZUKIZAWA, H.; NISHIDA, Y.; MUROTA, H.; KATAYAMA, I.; YOSHIKAWA, K. Case of urticaria due to cochineal dye in red-colored diet. **Alerugi=[Allergy]**, v. 56, n. 12, p. 1510-1514, 2007.

KUMAR, D.; ROY, R.; PARASHAR, A.; RAICHUR, A. M.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A.; MUKHERJEE, A. Toxicity assessment of zero valent iron nanoparticles on *Artemia salina*. **Environmental Toxicology**, v.32, n.5, p. 1617–1627, 2017.

KUNKELY, H.; VOGLER, A. Absorption and luminescence spectra of cochineal. **Inorganic Chemistry Communication**, v. 14, p. 1153-1155, 2011.

KUS, E.; EROGLU, H. E. Genotoxic and cytotoxic effects of sunset yellow and brilliant blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 28, n. 1, p. 227-230, 2015.

LACERDA, L. P.; MALAQUIAS, G.; PERON, A. P. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 86, n. 3, p. 1147-1150, 2014.

LEDERER, J. **Alimentação e câncer**. São Paulo: Manole, 1990

LERDA, D.; BIAGI, B. M.; PELLICIONI, P.; LITTERIO, N. *Allium cepa* as a biomonitor of ochratoxin A toxicity and genotoxicity. **Plant Biol**, v. 12, p. 685-688, 2010.

LIBRALATO, G. The case of *A. spp.* in nanoecotoxicology. **Marine Environmental Research**, v.101, p.38-43, 2014.

LIM, H. S.; CHOI, J. C.; SONG, S. B.; KIM, M. Quantitative determination of carmine in foods by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.158, p.521-526, 2014.

LIMAN, R.; CİĞERCI, I. H.; AKYIL, D.; EREN, Y. K. M. Determination of genotoxic effect of fenaminosulf by *A.* and Comet tests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 61–64, 2011.

LIZASO, M. T.; MONEO, I.; GARCIA, B. E.; ACERO, S.; QUIRCE, S.; TABAR, A. I.

Identification of allergens involved in occupational asthma due to carmine dye. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 84, n. 5, p. 549-552, 2000.

LOUZADA, M. L. D. C.; MARTINS, A. P.; CANELLA, D. S.; BARALDI, L. G.; LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; MOUBARAC, J. C.; CANNON, G.; MONTEIRO, C. A. Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 38, 2015.

MACKINSKI-JR, M. Estimates of maximum limits of food colors use in brazil through the Danish budget method and the baerand wuertzen-modified method. **Food Additive Contamination**, v. 15, n. 4, p. 481-186, 1998.

MARQUES, G. S.; SILVA, S. I. D. O. D.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Cytotoxic and genotoxic potential of liquid synthetic food flavorings evaluated alone and in combination. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 35, n. 1, p. 183-188, 2015.

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SOUZA, T. S. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 148, p. 481-486, 2016.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v. 56, p.60-69, 2015.

MAZZEO, D. E.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Celular damages in the *A. cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011.

MAZZEO, D.E.C. **Avaliação da viabilidade de lodo de esgoto como recondicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios**. Dissertação (mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Universidade Estadual Paulista Júnior de Mesquita Filho, Rio Claro, p. 225, 2013.

MENDONÇA, J. N. **Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 121, 2011.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982

MILARÉ, É. **Direito do Ambiente**. 10. Ed. São Paulo: Editora Revista dos Tribunais, 2015.

MILLER, R. J.; BENNETT, S.; KELLER, A. A.; PEASE, S.; LENIHAN, H. S. TiO<sub>2</sub> nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

MORRISON, J. M.; WRIGHT, C. M.; JOHN, G. H. Identification, isolation and characterization of a novel azoreductase from *Clostridium perfringens*. **Anaerobe**, London, v. 18, n. 2. p. 229–234, 2011.

MOURA, R. A. M. MARQUES, M. M. M.; PEREIRA, H. M.; SALES, I. M. S.; SANTOS, F. K. S.; GUEDES, M. I. F.; PERON, A. P. Industrial milk powder in bioassays for evaluation of cytotoxicity and genotoxicity. **Bioscience journal**, v. 33, n. 6, p. 1622-1631, 2017.

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 and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2934-2944, 2010.

NACEUR, H. B.; JENHANI, A. B. R.; ROMDHANE, M. S. Impacts of salinity, temperature, and pH on the morphology of *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) from Tunisia. **Zoological Studies**, v. 51, n. 4, p. 453-462, 2012.

NETTO, R. C. M. Dossiê corantes. **Food Ingredients Brasil**, n. 9, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>>. Acesso em: 22 Abr. 2018.

NEVES, C.S.; GOMES, S. S. L.; SANTOS, T. R.; ALMEIDA, M. M.; SOUZA, Y. O.; GARCIA, R. M. G. The Phytoecdysteroid  $\beta$ -ecdysone is genotoxic in Rodent Bone Marrow Micronuclei and *Allium cepa* L. Assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 177, p. 81–84, 2016.

NIOSH - Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. 2011. **Current Intelligence Bulletin 63**. Disponível em: <<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/2/1/8>>. Acesso em: 4 Mai. 2018.

NISHIE, K.; WAISS JR, A. C.; KEYL, A. C. Pharmacology of alkyl and hydroxyalkylpyrazines. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 17, n. 1, p. 244-249, 1970.

NISHIE, K.; WAISS JR, A. C.; KEYL, A. C. Toxicity of methylimidazoles. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 14, n. 2, p. 301-307, 1969.

NORIZADEH, T.; TOPAKTAS, M.; YILMAZ, M. B. Assessment of chromosomal aberration in the bone marrow cells of *swiss albino* mice treated by 34-methylimidazole. **Drug Chem. Toxicol.** v. 39, n. 3, p. 307–311, 2016a.

NORIZADEH, T.; TOPAKTAS, M.; YILMAZ, M.B.; HAJIPOUR, O.; VALIPOUR, E. Delineating the antigenotoxic and anticytotoxic potentials of 4 methylimidazole against ethyl methanesulfonate toxicity in bone marrow cell of swiss albino mice. **Bratisl. Lek. Listy**, v. 117, n. 5, p. 290–294, 2016b.

NTP – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Methylimidazole (CAS N<sup>o</sup>. 822–36–6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). 2007. Disponível em: <[http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr535.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr535.pdf)>. Acesso em: 18 Abr. 2018.

OHGIYA, Y.; ARAKAWA, F.; AKIYAMA, H. Molecular cloning, expression, and characterization of a major 38-kd cochlear allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1158-1162, 2009.

OLIVEIRA, J. P. W.; SANTOS, R. N.; BOEIRA, J. M. Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.1, p. 15-22, 2012.

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

OSMAN, I. F.; JACOB, B. K.; ANDERSON, D. Effect of nanoparticles on human cells from healthy individuals and patients with respiratory diseases. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 26-27, 2011.

PEREIRA, L. F.; INÁCIO, M. L. C.; PEREIRA, R. C.; PEREIRA, M. C. A. Prevalência de Aditivos em Alimentos Industrializados Comercializados em uma Cidade do Sul de Minas Gerais. **Revista Ciências em Saúde**, v. 5, n. 3, 2015.

PÉREZ, Y. G.; GILLING, P. A. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. **Anuario Toxicología**, v. 1, n. 1, p. 104-8, 2010.

PERIASAMY, V. S.; ATHINARAYANAN, J.; AL-HADI, A. M.; AL JUHAIMI, F.; MAHMOUD, M. H.; ALSHATWI, A. A. Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 176-186, 2015.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159. 2009.

POLETTO, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (mart. ex benth. jf macbr: fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *allium cepa*/Analysis of mutagenicity hydrossoluble extract *Derris rariflora*. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 1, p. 163-176, 2011.

POLÔNIO, M. L. T. **Percepção de mães quanto aos riscos à saúde de seus filhos em relação ao consumo de aditivos alimentares: o caso dos pré-escolares do Município de Mesquita**. Tese (Doutor em Ciências) - Fiocruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, p. 151, 2010.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20, 2015.

RAJAN, J. P.; SIMON, R. A.; BOSSO, J. V. Prevalence of sensitivity to food and drug additives in patients with chronic idiopathic urticaria. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 2, p. 168-171, 2013.

RAMKUMAR, K. M.; MANJULA, C.; GNANAKUMAR, G.; KANJWAL, M. A.; SEKAR, T. V.; PAULMURUGAN, R.; RAJAGURU, P. Oxidative stress-mediated cytotoxicity

and apoptosis induction by TiO<sub>2</sub> nanofibers in HeLa cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 2, p. 324-333, 2012.

ROCHA G. C. E.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenóides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v.42, n.8, p.1510-1517, 2012.

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

ROSSI, E. M.; PYLKKANEN, L.; KOIVISTO, A. J.; NYKASENOJA, H.; WOLFF, H.; SAVOLAINEN, K.; ALENIUS, H. Inhalation exposure to nanosized and fine TiO<sub>2</sub> particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2010.

ROVINA, K.; PRABAKARAN, P. P.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. M. Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products-a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 47-56, 2016.

RUTKUNAS, V.; SABALIAUSKAS, V.; MIZUTANI, H. Effects of different food colorants and polishing techniques on color stability of provisional prosthetic material. **Dental Materials Journal**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 167–176, 2010.

SÁ, P.; FERREIRA, F. A.; NOVA, R. D. V.; MOURÃO, T. V.; ANDRADE, V. L. Â. Uso abusivo de aditivos alimentares e transtornos de comportamento: há uma relação?. **International Journal of Nutrology**, v. 9, n. 2, p. 209-215, 2016.

SALES, I. M. S.; DE OLIVEIRA, J. D.; DOS SANTOS, F. K. S.; FEITOZA, L. L.; SOUSA, J. M. D. C.; PERON, A. P. Toxicity at the cellular level of artificial synthetic flavorings. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 38, n. 3, p. 297, 2016.

SAMPSON, H. A.; ACEVES, S.; BOCK, S. A.; JAMES, J.; JONES, S.; LANG, D. Food allergy: a practice parameter update - 2014. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 5, p. 1016–1025, 2014.

SANTOS, D. C.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Química Nova**, v.40, n.2, 2017.

SARIKAYA, R.; SELVI, M.; ERKOÇ, F. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. **Chemosphere**, v. 88, p. 974–979, 2012.

SAUVAGE, C. Controverse l'hypersensibilité aux additifs alimentaires est une réalité clinique: pour. **Revue Francaise D'allergologie**, v. 50, n. 3, p. 288–291, 2010.

SENGAR, G.; SHARMA, H. K. Food caramels: a review. **J. Food Sci. Technol.** v. 51, n. 9, p. 1686–1696, 2014.

SEYFRIED, M. **Triagem da atividade antitumoral de extratos vegetais utilizando**

**ensaios de toxicidade in vivo sobre *Artemia salina* e in vitro sobre células da linhagem HeLa.** Monografia (Especialização em Biologia Celular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 89, 2017.

SHAW, D. W. Allergic contact dermatitis from carmine. **Dermatitis**, v. 20, n. 5, p. 292-295, 2009.

SHIMADA, C.; KANO, K.; SASAKI, Y. F.; SATO, I.; TSUDUA, S. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. **The Journal of Toxicological Sciences**, Japão, v.35, n. 4, p. 547-554, 2010.

SILVA, A. A.; BOHM, F. M. L. Z.; Estudos dos efeitos do chá do *Agaricus blazei* (Cogumelo do sol) no índice mitótico das células meristemáticas do *Allium cepa* (Cebola). **Revista Diálogos & Saberes**, v. 8, n. 1, 2012.

SILVA, E. M. F.; NASCIMENTO, R. B. C.; BARRETO, F. S.; MORAES-FILHO, M. O.; GRIZ, S. A. S.; SANTOS, A. F.; MOUSINHO, K. C. Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, 2015a.

SILVA, L. M.; CARVALHO, F. R. S.; MARTINS, L. V.; FERNANDES, H. B.; CALOU, I. B. F.; PERON, A. P. Antiproliferative effect of the hydroalcoholic extract of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae, Caesalpinioideae) on the cell cycle of roots of *L. Allium cepa*. **Biotemas**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2015b.

SILVA, S. I. O.; SANTANA, G. M.; SALES, I. M. S.; SOUSA, J. M. D. 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, 2016.

SIMÃO, V. **Avaliação da qualidade de alimentos completos para aves de companhia quanto ingredientes, corantes artificiais, fungos e micotoxinas.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 194, 2010.

SINCOBESP. **A presença das cores na Alimentação Animal.** 2013. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/sincobesp/noticias/a-presenca-das-cores-na-alimentacao-animal/>>. Acesso em: 29 Mai. 2018.

SKOCAJ, M.; FILIPIC, M.; PETKOVIC, J.; NOVAK, S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? **Radiology and Oncology**, v. 45, n.4, p. 227-247, 2011.

SOUZA, C. S. H. **Genotoxicidade e citotoxicidade de corantes azoicos em ensaio do micronúcleo in vivo (Swiss Albinus).** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – UNIFENAS, Alfenas, p. 73, 2015.

SOUZA, R. M. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios a saúde.** Monografia (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário Estadual Da Zona Oeste, Rio de Janeiro, p. 65, 2012. Disponível em: <[http://www.uezo.rj.gov.br/tccs/ccbs/Rosilane Moreth de Souza.pdf](http://www.uezo.rj.gov.br/tccs/ccbs/Rosilane%20Moreth%20de%20Souza.pdf)>. Acesso em: 20 Jun. 2018.

SUGIMOTO, N.; YAMAGUCHI, M.; TANAKA, Y.; NAKASE, Y.; NAGASE, H.;

AKIYAMA, H.; OHTA, K. The basophil activation test identified carminic acid as an allergen induced anaphylaxis. **J. Allergy Clin. Immunol. Pract.** v. 1, p. 197-199, 2013.

SUTARIYA, V. B.; PATHAK, V.; GROSHEV, A.; CHOUGULE, M. B.; NAIK, S.; PATEL, D.; PATHAK, Y. Introduction--Biointeractions of nanomaterials, challenges and solutions. In: SUTARIYA, V. B.; PATHAK, Y. **Biointeractions of nanomaterials**. Boca Raton, 2015.

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

TEDESCO, S. B.; LAUGHINHOUSE IV, H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: SRIVASTAVA, J. **Environmental Contamination**. Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-A.-cepa-test>>. Acesso em: 24 Mai. 2018.

TEOW, Y.; ASHARANI, P. V.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETTIL, S. Health impact and safety of engineered nanomaterials. **Chemical Communications**, v. 47, n. 25, p. 7025-7038, 2011.

TOMASKA, L. D.; BROOKE-TAYLOR, S. Food Additives. In: MOTARJEMI, Y.; MOY, G.; TODD, E. (ed.). **Encyclopedia of Food Safety**, 1 ed. v. 2. Cambridge: Academic Press, 2014. p. 449-454.

TÜRKOĞLU, Ş. Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Toxicology and industrial Health**, v. 31, n. 9, p. 792-801, 2015.

TÜRKOĞLU, Ş. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate, and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium. cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2035–2041, 2008.

TÜRKOĞLU, Ş. Evaluation of genotoxic effects of sodium sulphite, potassium sulphite and calcium sulfite on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 18, p. 804–810, 2009.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxic effects of mono-, di-, and trisodium phosphate on mitotic activity, DNA content, and nuclear volume in *Allium cepa* L. **Caryologia**, v. 62, n. 3, p. 171–179, 2009.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, p. 4–14, 2007.

VAKILI-SAATLOO, N.; SADIGHARA, P.; JAHED-KHANIKI, G.; 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.

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

VELOSO, L. A. **Corantes e Pigmentos - Dossiê Técnico**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Instituto de Tecnologia do Paraná, 2012.

VENTURINI, A. C.; CAVENAGHI, A. D.; CASTILLO, C. J.C.; QUIÑONES, E. M. Sensory and microbiological evaluation of uncured fresh chicken sausage with reduced fat content. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 629-634, 2011.

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

VOLTOLINI, S.; PELLEGRINI, S.; CONTATORE, M.; BIGNARDI, D.; MINALE, P. New risks from ancient food dyes: cochineal red allergy, **EUR. Ann. Allergy Clin. Immunol.**, v. 46, n. 6, p. 232-233, 2014.

WÜTHRICH, B.; KÄGI, M. K.; STÜCKER, W. Anaphylactic reactions to ingested carmine (E120). **Allergy**, v. 52, n. 11, p. 1133-1137, 1997.

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

YAMAKAWA, Y.; OOSUNA, H.; YAMAKAWA, T.; AIHARA, M.; IKEZAWA, Z. Cochineal extract-induced immediate allergy. **The Journal of dermatology**, v. 36, n. 1, p. 72-74, 2009.

YILMAZ, U. T.; ERGUN, F.; YILMAZ, H. Determination of the food dye carmine in milk and candy products by differential pulse polarography. **J. Food Drug Anal.**, v. 22, p. 329-335, 2014.

YU, J. X.; LI, T. H. Distinct biological effects of different nanoparticles commonly used in cosmetics and medicine coatings. **Cell & bioscience**, v. 1, n. 1, p. 19, 2011.

ZENAIDI, M.; PAULIAT, S.; CHALIER, P.; FRATTA, A.; GIRARDET, J. Allergy to food colouring. A prospective study in ten children. **La Tunisie medicale**, v. 83, n. 7, p. 414-418, 2005.

ZENKNER, F. F.; ABLING, F.; DALLEMOLE, D. R.; KÖHLER, A. P. D.; RIEGER, A. Avaliação da genotoxicidade do rio Pardinho utilizando o ensaio cometa em *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819. **Caderno de Pesquisa**, v. 25, n. 3, p. 79-93, 2014.

ZHAO, J.; BOWMAN, L.; ZHANG, X.; VALLYATHAN, V.; YOUNG, S. H.; CASTRANOVA, V.; DING, M. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 72, n. 19, p. 1141-1149, 2009.

ZHAO, J.; CASTRANOVA, V. Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 14, p. 593-632, 2011.

ZILIFDAR, F.; ALPER-HAYTA, S.; YILMAZ, S.; KAPLAN-ÖZEN, Ç.; FOTO, E.; AYDOĞAN, Z.; DIRIL, N. Genotoxic potentials and eukaryotic DNA topoisomerase I inhibitory effects of some benzoxazine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 1, p. 480-486, 2014.

ZUCKER, R. M.; MASSARO, E. J.; SANDERS, K. M.; DEGN, L. L.; BOYES, W. K. Detection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cells by flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 7, p. 677-685, 2010.