

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
CAROLINA SOARES HORTA DE SOUZA

GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE CORANTES AZÓICOS EM ENSAIO DO
MICRONÚCLEO *IN VIVO* (*SWISS ALBINUS*)

Alfenas-MG

2015

CAROLINA SOARES HORTA DE SOUZA

GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE CORANTES AZÓICOS EM ENSAIO DO
MICRONÚCLEO *IN VIVO* (*SWISS ALBINUS*)

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Co-orientadora: Nelma de Mello Silva Oliveira, BVSC, MSc, PhD.

Alfenas-MG

2015

Souza, Carolina Soares Horta de
Genotoxicidade e citotoxicidade de corantes azóicos
em ensaio do micronucleo *in vivo* (*Swiss albinus*)/.—
Carolina Soares Horta de Souza. -- Alfenas, 2015.
74f.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes
Boriollo

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade José do Rosário Vellano.

1. Corantes azoicos. 2. Biomarcador genotóxico. 3.
MNPCE. 4. Roedores. 5. Mutagenicidade. I. Título

CDU: 575 (043.3)



UNIFENAS

Pesquisa e Pós-graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: “GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE CORANTES AZÓICOS EM ENSAIO DO MICRONÚCLEO *IN VIVO* (SWISS ALBINUS)”.

Autor: CAROLINA SOARES HORTA DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo
Orientador

Profa. Dra. Nelma de Melo Silva Oliveira

Prof. Dr. Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento

Prof. Dr. Aداuton Vilela de Rezende
Coordenador do Programa
Mestrado em Ciência Animal

Dedico este trabalho a minha filha Luiza, que tanto me ensinou sobre o amor. Dentre todos os ensinamentos, certamente, este foi o meu maior aprendizado. E ao meu marido João, que, além da sua incessante paciência e dedicação, contribui diariamente para manter a nossa, então, família unida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, que colocou cada peça fundamental em seu devido lugar para que eu ingressasse e concluísse este curso.

Ao meu eterno “orientador”, cativante por natureza, *Prof. Dr. João Evangelista Fiorini*. Não há palavras, nem para agradecer tudo que fez por mim e muito menos para descrever as suas inúmeras qualidades que se somam e resultam numa capacidade incrível de ser único e tão especial.

Ao meu querido orientador *Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo*. Quanta dedicação! Obrigada pelo exemplo de perseverança, de ser humano, de profissional e amigo. Devo-o tanto! É, sem dúvida, o meu mestre!

À *Prof.^a Dr.^a Nelma*, pelo carinho e empenho para que tudo se concretizasse com tanto primor.

Aos amicíssimos e queridos *Renato* (e família) e *Giovani* (e família).

À *Lu*, por toda compreensão, amizade e esforços sem medida.

À *Thaísia*, *Jeferson* e *Ju* pelo coleguismo na sua mais verdadeira tradução.

Aos muitos *colegas de turma* que tornaram o árduo trabalho divertido, ao passo que promissor.

Aos tantos *amigos e colegas de trabalho* pela alegria de viver e compartilhar tão bons momentos de reflexão e lazer, necessários para restabelecer as “energias”.

À minha mãe *Pilar*, meu pai *Mauro* e segunda mãe e avó *Ofélia*, jóias da minha vida, que me educaram, e ainda o fazem, para que eu corra atrás dos meus sonhos e trace meus planos com êxito e dedicação.

À minha irmã *Maria e* madrasta/amiga *Paula* por tanto amor e torcida.

Ao meu irmão *Luiz Fernando*, que, mesmo em outro plano, esteve comigo e, certamente, orgulha-se deste resultado.

Ao *Brutus*, que, mesmo sendo um cão, fez-me companhia nas intermináveis tardes de estudo. Sempre o meu melhor amigo.

À minha *família* pelo incentivo, apoio e grandes exemplos.

À Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS.

À *Rede Mineira* de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos (REDE MINEIRA TOXIFAR – 2014), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

SOUZA, Carolina Soares Horta. **Genotoxicidade e citotoxicidade de corantes azóicos em ensaio do micronúcleo *in vivo* (*Swiss albinus*)**. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – UNIFENAS, Alfenas, 2015.

A adição de corantes em alimentos e rações assume papel importante na indústria alimentícia sob o ponto de vista tecnológico. Corantes naturais são difíceis de serem utilizados em produtos padronizados, portanto, foram criados corantes sintéticos. Dentre os corantes sintéticos artificiais permitidos por lei, estão aqueles do grupo Azo e seu uso é um dos avanços mais controversos no setor. A utilização destas substâncias continua levantando uma série de dúvidas quanto à toxicidade, uma vez que, na literatura, trabalhos com esse ímpeto são escassos e controversos. Neste contexto, objetivou-se, com este trabalho, avaliar o potencial genotóxico de corantes azóicos através do ensaio de micronúcleo (MN). O teste do MN é amplamente utilizado e aceito internacionalmente para avaliação de ações mutagênicas. O teste *in vivo* foi aplicado para investigação de genotoxicidade observada em Eritrócitos Policromáticos (PCE) extraídos da medula óssea do fêmur de 168 camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, submetidos a cinco tratamentos (N-Nitroso-N-etilureia: controle⁺; 150 mM NaCl: controle⁻; corante a 1, 1,5 e 2 g.Kg⁻¹), sendo utilizados quatro corantes azóicos (Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Vermelho 40, Ponceau 4R) nos tempos de 24h e 48h (após estes períodos foi executada eutanásia). Foi analisada também a relação PCE/NCE, cujo se trata de um importante biomarcador de citotoxicidade. Os dados obtidos no ensaio de MN foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando um esquema fatorial de 5 × 2 × 2 (tratamento × sexo × tempo), e comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) usando o programa computacional SAS[®] versão 9.3. O corante Tartrazina apresentou genotoxicidade dose e sexo dependentes; Amarelo Crepúsculo foi genotóxico independente do sexo; Vermelho 40, a sua genotoxicidade foi dependente do tempo de exposição e do sexo do animal; a genotoxicidade do corante Ponceau 4R foi dependente da dose administrada e do tempo até a eutanásia. Contudo, pode-se concluir que estudos envolvendo estes aditivos alimentares devem ser realizados frequentemente com a finalidade de

atualização constante de dados que ofereçam segurança para seu consumo, uma vez que todos os quatro corantes testados nesta pesquisa apresentaram algum grau de toxicidade. Lembrando que os mesmos possuem o uso regulamentado por legislação específica, que estabelece os Limites Máximos Permitidos (LMP) e padrões de Ingestão Diária Aceitável por humanos, extrapolados para animais. Porém, apesar do controle exigido pelas agências reguladoras, a utilização de corantes em alimentos continua levantando uma série de dúvidas, principalmente devido a escassez de trabalhos avaliando a toxicidade destes compostos o que reforça a atenção que lhes deve ser conferida.

Palavras-chave: Corantes azóicos, biomarcador genotóxico, MNPCE, mutagenicidade, PCE/NCE.

ABSTRACT

SOUZA, Carolina Soares Horta. **Genotoxicity and cytotoxicity of azodyes in the *in vivo* micronucleus test (*Swiss albinus*)**. 73f. Dissertation (Master of Animal Science) – UNIFENAS, Alfenas, 2015.

The addition of the food coloring plays an important role in the food industry under the technological point of view. Natural dyes are difficult to navigate in standard products, so we were created synthetic dyes. Among artificial synthetic dyes allowed by law, are those of azo group and its use is one of the most controversial developments in the sector. The use of these substances is still raising a lot of questions as to toxicity, because in the literature, working with this momentum is limited and controversial. In this context, the aim, with this study was to evaluate the genotoxic potential of azo dyes by the micronucleus assay (MN). The MN test is widely used and internationally accepted for evaluation of mutagenic actions. The *in vivo* genotoxicity test was applied to research observed in erythrocytes Polychromatic (PCE) extracted from the bone marrow of the femur 168 Swiss mice Albinus, male and female, underwent five treatments (N-nitroso-N-ethylurea: control⁺; 150 mM NaCl: Control⁻; dye at 1, 1.5 and 2 g.Kg⁻¹) and used four azo dyes (Tartrazine, Sunset Yellow, Red 40, Ponceau 4R) for 24h and 48h (after this time euthanasia was performed). We analyzed also the PCE/NCE ratio, which it is an important marker of cytotoxicity. The data obtained in the MN assay were subjected to analysis of one-way variance (ANOVA) using a factorial scheme of 5 × 2 × 2 (treatment × sex × time), and average compared to Tukey's test ($p < 0.05$) using SAS[®] software version 9.3. The dye Tartrazine showed genotoxicity dose- and sex-dependent; Sunset Yellow was genotoxic sex-independent; Red 40, its genotoxicity was dependent on the exposure time and the sex of the animal; the dye Ponceau 4R genotoxicity depends on the dose and time until euthanasia. However, it can be concluded that studies of these food additives often must be performed in order to constantly update data that are safe for consumption, since all four dyes tested in this study showed some degree of toxicity. Recalling that they have the use regulated by specific legislation establishing the Maximum Allowable Limits (LMP) and patterns of Acceptable Daily Intake for humans, extrapolated to animals. However, despite the control required by regulatory agencies, the use of dyes in food continues to raise a number of questions, mainly due to lack of studies evaluating the toxicity of these compounds which reinforces the attention they should be given.

Keywords: Azodyes, biomarker genotoxic, MNPCE, mutagenicity, PCE/NCE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estrutura química dos principais corantes utilizados em alimentos	23
FIGURA 2	Estrutura química do Azobenzeno	25
FIGURA 3	Formação do micronúcleo em células da linhagem eritrocitária	37
FIGURA 4	Formação dos eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) na medula óssea	38
FIGURA 5	A incidência de MNPCes e PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após testar por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Red 40 ^{E-129}	55
FIGURA 6	A incidência de MNPCes e PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após testar por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Ponceau 4R ^{E-124}	56
FIGURA 7	A incidência de MNPCes e PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após testar por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Tartrazina ^{E-102}	57
FIGURA 8	A incidência de MNPCes e PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após testar por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Amarelo crespúsculo ^{E-110}	58

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	Propriedades dos corantes artificiais permitidos para uso em alimentos e rações no Brasil.	26
TABELA 2	Relação dos corantes artificiais permitidos no Brasil, respectivos INS, IDA e LMP.	27
TABELA 3	Incidência de MNPCes e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Red 40 ^{E-129} .	47
TABELA 4	Incidência de MNPCes e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Ponceau 4R ^{E-124} .	49
TABELA 5	Incidência de MNPCes e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Tartrazina ^{E-102} .	51
TABELA 6	Incidência de MNPCes e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> , machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Amarelo crespúsculo ^{E-110} .	53
QUADRO 1	Uso dos quatro azocorantes artificiais abordados em alguns países.	36
QUADRO 2	Resumo dos resultados de genotoxicidade e citotoxicidade de corantes azóicos segundo fatores dependentes.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
ANOVA	Análise da variância <i>one-way</i>
BFB	<i>Breakage-fusion-bridge</i>
cDNA	<i>Complementary desoxirribonucleic acid</i>
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEPEAU	Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UNIFENAS
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DOX	Cloridrato de doxorrubicina
DSBs	<i>Double-strand breaks</i>
E	Eutanásia
PCE	Eritrócitos policromáticos
NCE	Eritrócitos normocromáticos
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FOHALS	<i>Food oil of seeds of H. annuus L.</i>
G	Gramas
<i>H. annuus L.</i>	<i>Helianthus annus Linné</i>
HepG2	<i>Human liver hepatocellular carcinoma cell line</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
Kg	Quilogramas
mL	Militros
mM	Milimolar
MN	Micronúcleo
MNPCEs	<i>Micronucleated polychromatic erythrocytes</i>
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acid</i>
N	Nível de ploidia

<i>N</i>	Número de camundongos
NaCl	Cloreto de sódio
NBUD	<i>Nuclear budding</i>
NEU	<i>N-Nitroso-N-ethylurea</i>
NPB	<i>Nucleoplasmic bridge</i>
NSL	<i>Non-saponifiable lipids</i>
POHALS	<i>Pharmaceutical oil of seeds of H. annuus L.</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
SSBs	<i>Single-strand breaks</i>
T	Tratamento
THALS	<i>Tincture of seeds of H. annuus L.</i>
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
Unib:SW	Camundongos heterogenéticos <i>Swiss albinus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Aditivos Alimentares	17
2.2	Corantes	18
2.2.1	<i>Definição</i>	19
2.2.2	<i>Classificação</i>	20
2.3	Corante Orgânico Sintético	22
2.3.1	<i>Riscos a saúde</i>	29
2.4	Legislação	33
2.5	Teste do Micronúcleo	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Corantes Azóicos	40
3.2	Sistema - Teste <i>in vivo</i>	40
3.3	Grupos experimentais	41
3.4	Processamento da medula óssea e análise de células	42
3.5	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	44
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A alimentação é um considerável meio de exposição do homem e dos animais a compostos diversos, uma vez que muitos agentes químicos são encontrados nos alimentos. Algumas destas substâncias podem ter efeitos tóxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos. Diversas pesquisas científicas têm ressaltado a importância dos hábitos alimentares relacionados ao risco de desenvolvimento de doenças tanto em humanos quanto em animais.

Nas últimas décadas, a substituição do alimento fresco por aqueles processados e a elaboração de rações e petiscos ricos em aditivos alimentares, vem, gradualmente, contribuindo para o empobrecimento da dieta.

Neste contexto, os aditivos alimentares assumem papel importante na indústria alimentícia sob o ponto de vista tecnológico. No entanto, deve haver uma preocupação maior no que se refere aos riscos à saúde provocados pela ingestão destas substâncias. Dentre os aditivos utilizados no processamento de alimentos, os corantes são os mais genotóxicos (SASAKI et al., 2002).

A adição de corantes nos alimentos surgiu da necessidade de fazer com que os produtos se tornassem mais atrativos e para restabelecer o aspecto inicial dos gêneros alimentícios, cuja cor foi alterada pelos processos de transformação, estocagem, embalagem e/ou distribuição.

Corantes naturais são difíceis de serem utilizados em produtos padronizados, portanto, foram criados corantes sintéticos. O controle destas substâncias é determinado pelos órgãos reguladores que os definem, classificam, determinam a sua utilização e oferecem valores para os limites de uso.

Dentre os corantes sintéticos artificiais permitidos pela legislação vigente, estão aqueles do grupo Azo. Estes aditivos não possuem valor nutricional e seu uso é um dos avanços mais controversos para a indústria de alimentos (POLÔNIO & PERES, 2009).

A atenção à qualidade do produto final, envolvendo as 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.

Apesar do controle exigido por lei, a utilização destas substâncias continua levantando uma série de dúvidas quanto à toxicidade, uma vez que, na literatura, trabalhos com esse ímpeto são escassos e controversos, o que justifica a realização desta pesquisa que tem por objetivo avaliar o potencial genotóxico de corantes azóicos artificiais por meio do ensaio de micronúcleo.

O teste do micronúcleo é amplamente utilizado e aceito internacionalmente para avaliação de ações mutagênicas (KIRSCH-VOLDERS et al., 1997; VANHAUWAERT et al., 2001). O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo e in vitro* (HAYASHI, 1983).

Espera-se que a avaliação pelo teste do micronúcleo em diferentes corantes azo forneça informações importantes para as etapas de análise do risco da ingestão de alimentos que os contem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os hábitos alimentares da população brasileira e mundial sofreram alterações significativas decorrentes das mudanças de estilo de vida e revolução tecnológica na produção de alimentos. Dessa forma, órgãos reguladores e a comunidade científica demonstraram preocupação quanto à substituição massiva de alimentos naturais por alimentos processados, e, conseqüentemente, o empobrecimento da dieta.

Quando um alimento é desenvolvido para animais, devem ser observadas as necessidades de cada espécie, respeitando tamanho, idade, raça e particularidades pertinentes (doenças). Quando se trata de humanos, principalmente grupos específicos que requerem uma dieta diferenciada, muitos cuidados também devem ser tomados. Além disso, a presença de inúmeros ingredientes e aditivos podem apresentar riscos toxicológicos quando estes não apresentam boa qualidade ou quando estão em quantidades acima do permitido.

A importância da qualidade do produto final, ingredientes e aditivos alimentares envolvidos na formulação de um alimento é uma forma de garantir a segurança dos produtos e da saúde dos homens e dos animais.

2.1. Aditivos Alimentares

A *Food and Agriculture Organization / World Health Organization* (FAO/WHO) define Aditivo Alimentar como “toda substância que não apresenta valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor; modificar ou manter seu estado físico geral, ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento”.

Segundo o comitê, conhecido por *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), aditivo alimentar é definido como qualquer substância que não se consome normalmente como alimento, nem tampouco se utiliza como ingrediente básico em alimentos, tendo ou não valor nutritivo, e cuja adição intencional ao alimento com fins tecnológicos (incluindo os organolépticos) em suas fases de fabricação, elaboração, preparação, tratamento, envasamento, empacotamento, transporte ou armazenamento, resulte ou possa preservar razoavelmente por si, ou seus subprodutos, em um componente do alimento ou um elemento que afete suas características (WHO/FAO, 1995).

A Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde [SVS/MS-540/97] define “aditivo alimentar como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento sem propósito de nutrir.” Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de determinado alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (ANVISA, 1997).

O JECFA, designado pela WHO/FAO, em 1962, baseado em dados experimentais, tem a finalidade de recomendar, ou não, o uso de determinado aditivo e estabelecer o valor da IDA (Ingestão Diária Aceitável) para cada um deles (WHO/FAO, 1995).

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 estes classificados nas seguintes categorias: tecnológicos, sensoriais, nutricionais, zootécnicos e anticoccidianos.

Sasaki et al. (2002) realizaram estudo de genotoxicidade com aditivos alimentares em oito tecidos de camundongos por meio do ensaio do cometa, sendo os corantes os mais genotóxicos dentre aqueles utilizados na indústria alimentícia.

2.2. Corantes

No que se refere aos atributos sensoriais a cor é a propriedade que apresenta importância proeminente e é um forte atributo sensorial (LUNING et al., 2008).

As cores estão intimamente ligadas a vários aspectos da vida e são capazes de influenciar as decisões do cotidiano, principalmente, as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade são afetadas pela cor. A ligação das cores aos alimentos está relacionado com o desenvolvimento cognitivo, que depende de memória e de experiências vivenciadas (PRADO & GODOY, 2003).

As cores são resultado da absorção de radiação eletromagnética na faixa da luz visível e estão relacionadas com comprimentos de onda particulares. Os compostos orgânicos podem absorver radiação eletromagnética, porém, a absorção de radiação na faixa da luz visível se

deve à presença de grupos cromóforos, ou seja, ligações duplas conjugadas na estrutura dos compostos. Estruturalmente, um dos únicos aspectos comuns a praticamente todos os corantes é a presença de um ou mais anéis benzênicos (LIMA et al., 2007).

2.2.1. Definição

Conforme a Resolução n. 44 de 1977, elaborada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos [CNNPA], considera-se corante “a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento”. Corantes naturais são difíceis de serem utilizados em produtos padronizados, para isso foram criados corantes sintéticos.

Corantes não possuem valor nutricional (POLÔNIO & PERES, 2009), mas por tornarem o produto mais atraente aos consumidores, o uso destes é um dos avanços mais controversos para a indústria alimentícia, principalmente quando se fala sobre corantes sintéticos artificiais (SILVA & REED, 2010; CHEESEMAN, 2012).

A adição de corantes nos alimentos surgiu da necessidade de fazer com que os produtos se tornassem mais atrativos aos consumidores (CLYDESDALE, 1993). Para Tricard et al. (1998) a manutenção da cor e o aspecto natural do alimento é um fator importante para o marketing do produto.

O uso de corantes é então utilizado para restabelecer o aspecto inicial dos gêneros alimentícios cuja cor foi alterada pelos processos de transformação, estocagem, embalagem e/ou distribuição e cujo aspecto visual encontra-se prejudicado; dar aparência mais atrativa aos alimentos; manter e reforçar a cor dos alimentos durante armazenamento e padronizar a cor dos alimentos, evitando a sua variação (TEIXEIRA, 1969).

A preocupação com o uso indiscriminado de corantes na alimentação humana e animal é originada pela divulgação de estudos que apontam reações adversas a estes aditivos, quer seja aguda ou crônica, tais como reações tóxicas desencadeando alergias, alterações no comportamento e carcinogenicidade (POLÔNIO & PERES, 2009).

Até 1850 todos os corantes alimentícios provinham de três fontes: vegetais comestíveis (cenoura, beterraba, casca de uva escura, etc); extratos de origem animal ou vegetal normalmente não consumidos como tais (ácido carmínico, estigma de açafrão, etc); e resultados da transformação de substâncias naturais (caramelo). Ao longo dos anos, mais de

oito mil compostos corantes são comercializados, dos quais 90% são sintéticos (LIMA et al., 2007).

2.2.2. Classificação

As indústrias utilizam tipos de corantes e pigmentos que se classificam em corante orgânico natural, corante orgânico sintético (artificial e idêntico ao natural), corante inorgânico, caramelo e caramelo obtido pelo processo de amônia (RIGONI, 2006).

Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1977):

- Corante orgânico natural: cuja origem é vegetal, ou eventualmente, animal, cujo princípio do corante tenha sido isolado com emprego de processos tecnológicos adequados, apresentando grau de pureza compatível com o seu emprego para fins alimentares. Os corantes naturais permitidos pela legislação brasileira são: açafrão, ácido carmínico ou cochonilha, antocianinas, carotenóides, betalaínas, clorofilas, curcuminas, hemoglobina, páprica, urucum, cacau, carvão, riboflavina.

- Corante orgânico sintético: é o corante obtido por síntese orgânica, com composição química definida

- Corante artificial: é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.

- Corante orgânico sintético idêntico ao natural: é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.

- Corante inorgânico: obtido a partir de substâncias minerais.

- Caramelo: este corante natural é obtido com aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.

- Caramelo (processo amônia): é o corante orgânico sintético idêntico ao natural que usa a amônia como catalisador no processo de produção.

Em uma análise comparativa sobre as vantagens de uso de corantes sintéticos, sobre corantes naturais, destacam-se a alta estabilidade a luz, oxigênio e pH, além de conferir uniformidade na cor, possuir baixa contaminação microbiológica e com um custo de produção relativamente baixo (HATHCOCK & RADER, 2003). Por se considerar estas particularidades como sendo extremamente positivas, os corantes sintéticos são extensivamente utilizados pela

maioria das indústrias que utilizam os corantes como matéria-prima (ENAYATZAMIR et al., 2009).

A indústria de alimentos utiliza em torno de 90% de corantes sintéticos nos processos (ALMEIDA et al., 2010). O fato de o custo de obtenção do corante azo ser mais atrativo é devido a natureza do processo de obtenção deste e a versatilidade da rota química envolvida na síntese. Além disso, a produção em escala industrial envolvendo o presente processo é relativamente simples, pois plantas químicas de multi-propósito poderiam ser utilizadas. Destaca-se também que tais rotas sintéticas permitem tipicamente altos rendimentos em operações conduzidas a temperatura próxima a ambiente, ou seja, sem demandas excessivas de energia. Contribuem também para o baixo custo destes processos a demanda de reagentes largamente disponíveis, tais como aminas aromáticas e fenóis. Por fim, ressalta-se que as reações ocorrem em meio aquoso, o que oferece óbvias vantagens econômicas e ambientais se comparados com outros solventes orgânicos (CHRISTIE, 2001).

No que se refere à absorvidade, devido à presença de estruturas aromáticas ou quinônicas unidas por duplas ligações, grupos alifáticos unidos a grupos carbonílicos, grupos azo, nitro, hidroxílicos e outros (DEL GIOVINE & BOCCA, 2003).

2.3. Corante Orgânico Sintético

O surgimento do primeiro corante sintético ocorreu em 1856, na Inglaterra, quando o químico britânico William Henry Perkin, aos 18 anos, realizava pesquisas para desenvolver uma droga antimalária. A droga não foi obtida, mas descobriu-se uma rota sintética para a produção de um corante orgânico púrpura, a malvaína ou corante anilina (MURMANN, 2004).

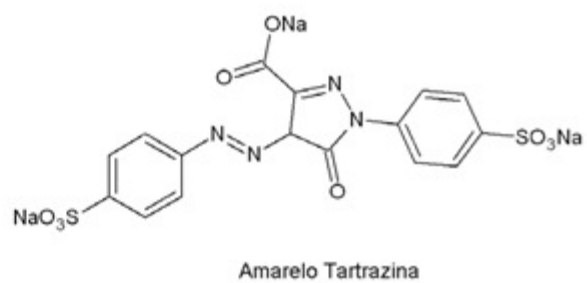
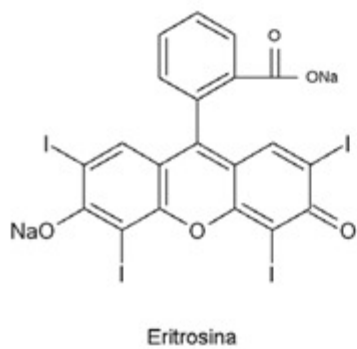
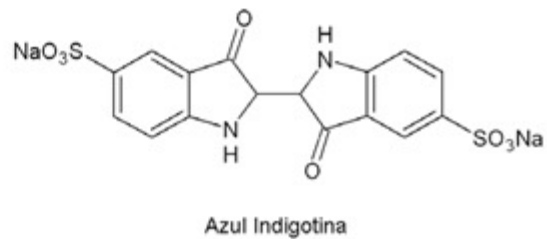
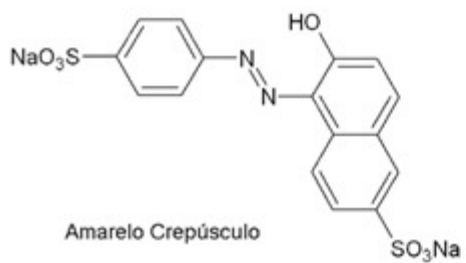
Na sequência desta descoberta, em 1907, começaram a surgir e ser comercializados agentes colorantes artificiais os quais eram adicionados em diversos tipos de alimentos populares, dentre os quais incluem ketchup, mostarda, vinho e geléias. Neste período estavam disponíveis no mercado mais de oitenta tipos de corantes sintéticos, sendo que estes agentes colorantes eram utilizados sem passar por testes de toxicidade ou verificação de efeitos colaterais (DOWNHAM & COLLINS, 2000; PINTEA, 2007).

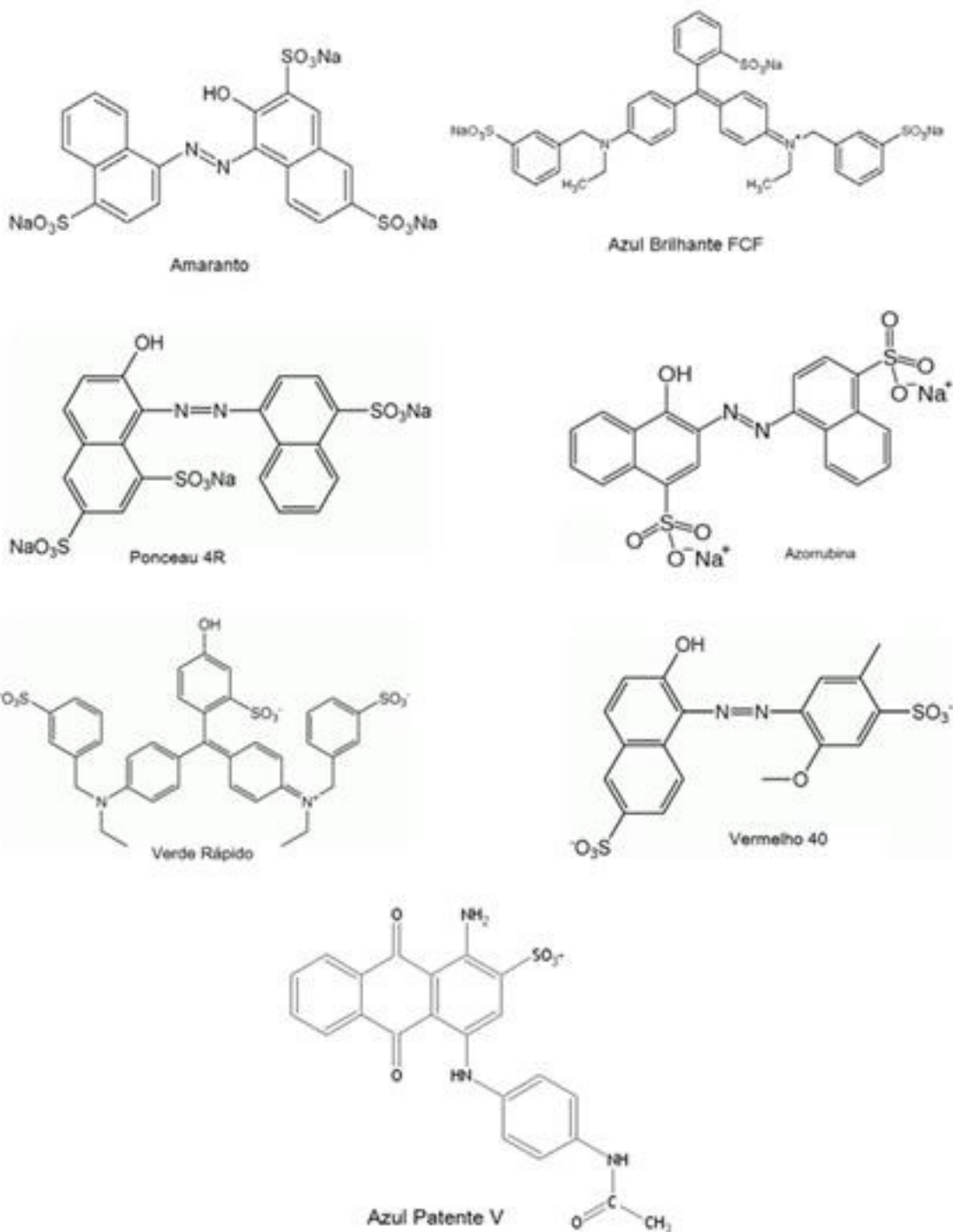
Os corantes orgânicos sintéticos são aqueles obtidos por síntese orgânica mediante o emprego de processos tecnológicos adequados e não encontrados em produtos naturais, sendo dividido em dois grupos: idênticos aos naturais e artificiais:

- Idênticos aos naturais: são substâncias sintéticas, cuja estrutura química corresponde as dos corantes naturais correspondentes, apresentando características de identidade e pureza apropriada ao seu emprego para fins alimentares. Os corantes sintéticos apresentam algumas vantagens em relação aos naturais. Muitos dos corantes naturais são sensíveis a luz, ao calor, ao oxigênio ou a ação das bactérias. Conseqüentemente, não são estáveis. Os sintéticos, mais estáveis, têm durabilidade maior e propiciam cores mais intensas. Também são utilizados em menores quantidades e muitas vezes são menos onerosos que os corantes naturais. Dentre os principais exemplos dessa classe tem-se: β -caroteno; β -apo-8'-carotenal; éster etílico ou metílico do ácido β -apo-8'-carotenóico; riboflavina; xantofilas (cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violoxantina). Essas substâncias conferem aos alimentos colorações amarelo e laranja de várias tonalidades diferentes (CARVALHO, 2004).

- Artificiais: os corantes artificiais são substâncias sintéticas, cuja estrutura química não corresponde a dos corantes naturais, apresentando características de identidade e pureza apropriadas ao seu emprego para fins alimentares. No Brasil, 11 corantes são admitidos para o uso em alimentos. Na FIG. 1 são apresentadas as estruturas químicas dos corantes artificiais permitidos para a utilização em alimentos no Brasil.

Figura 1 - Estrutura química dos principais corantes utilizados em alimentos





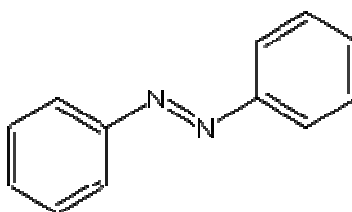
Fonte: Adaptado de Marmitt et al. (2010) e Prado & Godoy (2003).

Classificam-se os corantes sintéticos em duas categorias, de acordo com as estruturas químicas: grupo Azo e grupo Nonazo (INOUE et al., 2006). Grupo Azo é um grupo funcional do tipo R-N=N-R', no qual R e R' são grupos que contêm átomos de carbono e átomos de

nitrogênio ligados a dois radicais aromáticos. São chamados compostos azóicos, azoderivados ou azocompostos (SASAKI et al., 2002).

Os corantes de grupo Azo apresentam um anel de naftaleno ligado a um segundo anel de benzeno por uma ligação azo ($N = N$). Esses anéis podem conter um, dois ou três grupos sulfônicos. Em todo o mundo, este grupo representa a classe mais utilizada de corantes sintéticos pela indústria de alimentos (MORRISON et al., 2012).

Figura 2 – Estrutura química de Azobenzeno



Fonte: Lederer, 1990.

Algumas propriedades dos corantes artificiais permitidos para uso em alimentos e rações no Brasil estão relacionadas em duas tabelas (TAB. 1 e TAB. 2).

Tabela 1 - Propriedades dos corantes artificiais permitidos para uso em alimentos e rações no Brasil

Nome Usual	Tartrazina	Amarelo Crepúsculo	Azorrubina	Amaranto	Ponceau 4R	Eritrosina	Vermelho 40	Azul Patente V	Azul Indigotina	Azul Brillhante	Verde Rápido
Nome Químico	sal tri-sódico 5-hidroxi-1-(4-sulfofenil)-4-[(4-sulfofenil) azo]-pirazole-3-carboxilato	sal di-sódio 6-hidroxi-5-[(4-sulfofenil) azo]-naftaleno-2-sulfonato	sal di-sódico 4-hidroxi-3-[(4-sulfo-1-naftil) azo]-naftaleno-1-sulfonato	sal tri-sódico do ácido 3-hidroxi-4-(4-sulfo-1-naftil azo)-naftaleno-2,7-di-sulfonato	sal tri-sódico 7-hidroxi-8-(4-sulfo-1-naftil azo)-naftaleno-1,3-di-sulfonato	sal di-sódico 2,4,5,7-tetraiodo fluoresceína	sal di-sódico de 1-(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenilazo)-2-naftol-6-sulfonato	sal de cálcio di-4-[dietilamino ciclohexa-2,5-dienilideno-(4-dietilaminofenil) metil]-6-hidroxibenzeno - 1,3-di-sulfonato	sal di-sódico do ácido 5,5'-indigotino sulfonato	sal tri-sódico de 4',4"-di (N-etil-3-sulfonatobenzil amino)-trifenil metil-2-sulfonato	sal tri-sódico 4-[4-(N-etil-p-sulfobenzil amino) -fenil]-4-hidroxi-2-sulfofenil-metileno)-1-(N-etil-N-p-sulfobenzil)-Δ2,5-ciclohexa dienimina.
Classe	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	xanteno	monoazo	trifenilmetano	indigóide	trifenilmetano	trifenilmetano
Fórmula	C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₉ S ₂	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	C ₂₀ H ₆ I ₄ Na ₂ O ₅	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	C ₂₇ H ₃₁ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₂	C ₁₆ H ₆ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₂	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₁₀ S ₃
Massa Molar	534,35781	452,36374	502,42354	604,46361	604,46361	879,86194	496,41674	566,66147	466,34734	792,84314	808,84254
CAS Number	1934-21-0	2783-94-0	3567-69-9	915-67-3	2611-82-7	16423-68-0	25956-17-6	3536-49-0	860-22-0	3844-45-9	2353-45-9
Color Index (C.I.)	19140	15985	14720	16185	16255	45430	16035	42051	73015	42090	42053
Código Brasil	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
Absorção Máxima	λ _{max} = 426nm	λ _{max} = 480nm	λ _{max} = 515nm	λ _{max} = 523nm	λ _{max} = 505nm	λ _{max} = 526nm	λ _{max} = 502nm	λ _{max} = 635nm	λ _{max} = 610	λ _{max} = 629nm	λ _{max} = 625nm
Absortividade (em água)	1% E _{1cm} = 527	1% E _{1cm} = 551	1% E _{1cm} = 545	1% E _{1cm} = 438	1% E _{1cm} = 431	1% E _{1cm} = 1154	1% E _{1cm} = 556	1% E _{1cm} = 2000	1% E _{1cm} = 498	1% E _{1cm} = 1637	1% E _{1cm} = 1560
Solubilidade (g/100mL) a 25°C	Água 20 Glicerina 18 Propileno 7 Etanol <0,1	Água 19 Glicerina 20 Propileno 2,2 Etanol <0,1	Água 5-10 g/100mL a 19°C	Água 8 Glicerina 1,5 Propileno 0,4 Etanol <0,1	Água 25 Glicerina 1,4 Propileno 1,4 Etanol 0,02	Água 9 Glicerina 20 Propileno 20 Etanol 1	Água 22 Glicerina 3 Propileno 1,5 Etanol 0,001	Água < 10	Água 1,6 Glicerina 1 Propileno 0,1 Etanol <0,1	Água 20 Glicerina 20 Propileno 20 Etanol 0,15	Água < 10
IDA (mg/Kg peso corpóreo)	7,5	2,5	4,0	0,5	4,0	0,1	7,0	15,0	5,0	10,0	10,0
Sinónimos	Tartrazine, FD&C Yellow No. 5, Food Yellow No.4	Sunset yellow FCF; Food Yellow No.5, FD&C Yellow No.6	Carmoisine, Food Red 3, Acid ed 14	Amaranth; Food Red No.2; Bordeaus S	New coccine, Food Red 7, Food Red No.102	Erythrosine B, Food Red 14, Acid Red 18	Allura Red AC, Food Red 17	Acid blue 3; Patent Blue V, Food Blue 5	Índigo carmine, FD&C Blue No. 2, Food Blue No.2	FD&C Blue No.1, Food Blue 2, Brilliant blue FCF	Fast green FCF, Food Green 3, FD&C Green No 3

Fonte: Prado & Godoy (2003).

Tabela 2 - Relação dos corantes artificiais permitidos no Brasil, respectivos INS, IDA e LMP

Corante	INS ^a	IDA ^b mg/Kg/p.c. ^c	LMP ^d mg/kg
Amaranto	E-123	10	100
Eritrosina	E-127	5	100
Vermelho 40*	E-139	30	100
Ponceau 4R*	E-124	10	100
Amarelo Crepúsculo*	E-110	10	150
Tartrazina*	E-102	7,5	150
Indigotina	E-132	30	100
Azul Brilhante	E-133	30	100
Azurrubina	E-122	5	100
Verde Rápido	E-143	30	100
Azul Patente V	E-131	30	150

^a INS – International Numbering System. ^b IDA – Ingestão Diária Aceitável. ^c p.c. – peso corpóreo. ^d LMP – Limite Máximo Permitido. E – Corantes permitidos pela União Européia utilizam este prefixo. * Corantes utilizados neste estudo. Fonte: PCHTRG (1985); EC (2003; 2010).

Serão abordados neste trabalho os corantes amarelo crepúsculo, ponceau 4R, tartrazina e vermelho 40:

- Amarelo crepúsculo FCF (E 110): o corante amarelo crepúsculo é sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão e tintas azóicas (derivadas do petróleo). Possui boa estabilidade na presença de luz, calor e ácido, apresentando descoloração na presença de ácido ascórbico e dióxido de enxofre. Este corante é pouco solúvel em etanol e insolúvel em azeites, estável até 130 °C, em meio alcalino apresenta coloração vermelha. Propicia cor amarela e dentre suas principais aplicações está o uso em produtos como: cereais, aperitivos, confeitos, cereja em calda, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, revestimentos, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos (MULTON, 1988). Os Estados Unidos, Japão e países da União Européia permitem seu emprego em alimentos, já o Canadá permite seu emprego em alguns produtos específicos (BERDICK, 1982; DOWNHAM & COLLINS, 2000).
- Ponceau 4R (E 124): também sintetizado a partir do alcatrão do carvão, o corante ponceau 4R possui coloração vermelha, apresenta boa estabilidade ao calor, à luz e ao ácido, descolore parcialmente na presença de alguns agentes redutores como o ácido ascórbico e dióxido de enxofre. Não é permitido nos Estados Unidos, na Inglaterra seu uso é provisório e restrito, nos países da UE (União Européia) e no Japão seu uso é permitido, mas

foi voluntariamente banido pelos industriais japoneses. Isso se deve aos poucos estudos relevantes realizados sobre sua toxicidade (BERDICK, 1982; DOWNHAM & COLLINS, 2000).

- Tartrazina (E 102): o corante tartrazina é sintetizado a partir do alcatrão do carvão e confere a coloração amarela a alimentos como: cereais, aperitivos, confeitos, cereja em calda, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, revestimentos, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos. A tartrazina é pouco solúvel em etanol, solúvel em água, porém em meio alcalino apresenta coloração vermelha. Além disso, possui excelente estabilidade à luz, calor e ácido, sendo descolorido na presença de ácido ascórbico e dióxido de enxofre. É um dos corantes mais empregados em alimentos e é permitido em muitos países como Canadá, Estados Unidos e União Européia (BERDICK, 1982; DOWNHAM & COLLINS, 2000).

- Vermelho 40 (E 129): o corante vermelho 40 também é sintetizado quimicamente e é utilizado para conferir coloração vermelha principalmente em bebidas, doces, sobremesas, alimentos para animais. Este corante apresenta boa estabilidade à luz, calor e ácido, além de ser o corante vermelho mais estável para bebidas na presença do ácido ascórbico (IFT, 1986; DOWNHAM & COLLINS, 2000).

Devido ao uso indiscriminado destes corantes em alimentos e rações, surtos por intoxicação e até mortes de pessoas e animais desencadearam. Com isto, os corantes foram os primeiros aditivos sujeitos a regulamentação governamental nos Estados Unidos, sendo que, após avaliações toxicológicas, o FDA reduziu drasticamente o número de corantes sintéticos permitidos para estes fins (PINTEA, 2007).

2.3.1. Riscos à saúde

Dentre os possíveis efeitos tóxicos que estes corantes podem causar em humanos e animais destacam-se: reação anafilática, bronco-constricção, asma, bronquite, urticária, prurido, tumores na tireóide, dentre outros. Além disso, os corantes artificiais podem apresentar níveis altos de metais pesados, o que agravaria os riscos dessas substâncias ao organismo.

Os primeiros testes de mutagenicidade e/ou carcinogenicidade, empregando corantes para alimentos ocorreram no início do século quando Fischer demonstrou o efeito carcinogênico do corante vermelho escarlata (LEDERER, 1990). Desde então, vários outros corantes têm sido testados. Em alguns estudos foi encontrada ação mutagênica e/ou carcinogênica e seu uso se tornou restrito ou proibido (COMBES & HAVELAND-SMITH, 1982; CHUNG & CERNIGLIA, 1992; GIRI et al., 1992).

Observou-se que quantidade significativa de pacientes com hipersensibilidade à aspirina reagia a alguns aditivos, particularmente os de coloração amarela, laranja e vermelha, como a tartrazina, amarelo crepúsculo, Ponceau 4R e amaranto. As manifestações mais comuns são: asma, urticária, angiodema e rinite (SCHVARTSMAN, 1982).

A incidência de câncer intestinal em países demasiadamente industrializados pode estar relacionada diretamente ao consumo excessivo de alimentos contendo corantes azóicos (CHUNG, 1983). Estes podem ser metabolizados pela microbiota intestinal e muitos se mostraram mutagênicos no teste de Ames (CHUNG & CERNIGLIA, 1992). Os produtos da sua metabolização originam moléculas do tipo amino-azobenzeno. Essa potencialidade foi demonstrada em estudos realizados com microrganismos e células de mamíferos (AL-SABTI, 2000; JAGER et al., 2004; WANG et al., 2005).

Os azos corantes podem ser metabolizados em aminas aromáticas pelas azoredutases ou nitroredutases produzidas pela microbiota intestinal ou, ainda, por enzimas presentes no citoplasma de células de mamíferos, como as xantinas oxidases, e pelo citocromo P450 (NOVOTNY et al., 2006). Dessa forma, o intestino delgado é um possível órgão alvo de carcinogênese (SWEENEY et al., 1994). Se forem formadas N-hidroxilaminas, elas são capazes de causar danos ao DNA. Entretanto, algumas pesquisas mostraram que grupos ácidos sulfônicos e cromóforos azo podem conferir resistência aos corantes contra ataque microbiano (KULLA et al., 1983; NACHIYAR & RAJAKUMAR, 2004; MANSOUR et al., 2007).

No entanto, em estudos realizados, *in vivo* em ratos utilizando o teste do micronúcleo, por Poul et al. (2009), os corantes amarelo crepúsculo e tartarazina não foram capazes de causar um efeito genotóxico consistente em células intestinais do cólon por não apresentarem micronúcleos (ausência de clastogenicidade e aneugenicidade). Contudo, Sasaki et al. (2002) sugeriram um efeito genotóxico em ensaio de cometa *in vivo*. Ambas as pesquisas sugeriram efeitos transitórios pelos constantes danos ao DNA, os quais são incapazes de serem fixados em lesões genotóxicas estáveis, o que pode ser parcialmente explicado pela citotoxicidade local (células do cólon), produzidas pelos corantes e observados em análises histológicas (SASAKI et al., 2002; POUL et al., 2009).

O teste do micronúcleo é amplamente utilizado e aceito internacionalmente para avaliação do potencial mutagênico (KIRSCH-VOLDERS et al., 1997; VANHAUWAERT et al., 2001). Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que se originam durante a telófase da mitose, e não são incorporados no núcleo principal das células filhas após a divisão nuclear. O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo* e *in vitro* (HAYASHI, 1983).

A Organização Mundial de Saúde sugere que esta classe de corantes está relacionada a atividade tóxica e é responsável por provocar várias reações imunológicas, podendo causar asma. Considera-se que uma em cada dez mil pessoas apresentam reações adversas aos corantes azo.

Na última década, os corantes amarelo crepúsculo, vermelho bordeaux, e tartrazina, a partir dos resultados de ensaios com mamíferos, que apontaram poder mutagênico e carcinogênico, têm causado controvérsia quanto aos seus efeitos tóxicos, ocasionando a proibição de seu uso em alguns países, como os Estados Unidos e Japão (FENG et al., 2012). No entanto, em avaliações toxicológicas em outros países, como na Inglaterra e no Brasil, os mesmos não apresentaram toxicidade significativa em testes com roedores e continuam a ser comercializados livremente (ORSOLIN & NEPOMUCENO, 2009; MORRISON et al., 2012). Assim, de acordo com Rutkunas et al. (2010), os estudos sobre os efeitos adversos à saúde causados por corantes artificiais, principalmente aqueles do grupo azo, são insuficientes e bastante contraditórios.

Dentre os corantes azos, a tartrazina requer uma maior atenção dos toxicologistas e alergistas (CROCE, 1965; DOWNHAM & COLLINS, 2000), sendo apontada como a responsável por várias reações adversas, causando desde urticária até asma. Estima-se que

uma em cada dez mil pessoas apresenta reações a este corante (BERDICK, 1982). Provavelmente, de 8 a 20% dos consumidores sensíveis à aspirina, são também sensíveis a tartrazina.

O corante tartrazina tem sido alvo de estudos de mutagênese e carcinogênese, por produzir, como todos os corantes azóicos, como metabólito, o ácido sulfanílico, após ser reduzido por bactérias da microflora intestinal (MOUTINHO et al., 2007). Entretanto, uma revisão (OULD ELHKIM et al., 2007) indica que a tartrazina tem uma baixa biodisponibilidade oral em roedores, é rapidamente metabolizada no cólon e excretado nas fezes. Tartrazina é um dos corantes mais utilizados nas indústrias alimentícias.

Segundo Amin et al. (2010), a tartrazina provoca alterações nos parâmetros hepáticos e renais, com aumento significativo na alanina transaminase, aspartato transaminase, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, proteína total e albumina), e podem induzir estresse oxidativo pela formação de radicais livres. Além disso, pequenas moléculas podem reagir com o DNA através de ligação covalente ou interações não covalentes. Existem vários sítios no DNA molecular, onde a ligação pode ocorrer, entre dois pares de bases, no sulco menor, no sulco maior, no exterior da hélice e a ligação eletrostática (KASHANIAN et al., 2009).

Vermelho 40 também é um corante amplamente utilizado no Brasil (PAN et al., 2011), porém, existem poucos trabalhos na literatura científica com a finalidade de avaliar a sua citotoxicidade, mutagenicidade ou carcinogenicidade e os resultados destas pesquisas são contraditórios. Alguns demonstraram citotoxicidade e mutagenicidade e outros têm evidenciado nenhuma atividade citotóxica e até mesmo um potencial antimutagênico. A escassez de informações sobre este aditivo alimentar pode ser um problema, pois, como já mencionado, os corantes da classe azo são controversos na comunidade científica quanto à sua toxicidade, incluindo a nível celular. Estudos metabólicos mostraram que o vermelho 40 é pouco absorvido pelo organismo e em estudos de mutagenicidade não apresentou potencial carcinogênico, desta forma tendo seu uso liberado para alimentos no Canadá e Estados Unidos (IFT, 1986; DOWNHAM & COLLINS, 2000). No entanto, alguns dados publicados indicam que este corante induz aberrações cromossômicas em camundongos e alterações em células da medula óssea de ratos (OULD ELHKIM et al., 2007).

Estudos disponíveis, testes de mutagenicidade e ensaios de clastogenicidade nas células da medula óssea e estudos de longo prazo em ratos e hamsters sugerem que o corante amarelo crepúsculo não tem potencial de genotoxicidade e carcinogenicidade (JECFA, 1982; WEVER et al., 1989). Este corante é mal absorvido após administração oral (JECFA, 1982).

Alguns compostos podem interagir com o DNA quer covalentemente ou não. Em uma ligação covalente os compostos interagem com uma base de azoto de DNA, como a guanina N7. Por outro lado, a ligação não-covalente levam a interações do DNA que incluem intercalação eletrostática e ligação de complexos metálicos catiônicos ao longo do lado de fora da hélice do DNA. A intercalação envolve a inserção parcial de anéis aromáticos heterocíclicos entre os pares de bases de DNA (POLYANICHKO et al., 2004) o que pode induzir um grande hipocromismo (diminuição de absorvância) e significativa migração do pico característico para comprimentos de onda mais longos, como consequência da ligação com outras substâncias no espectro de absorção devido à interação de empilhamento forte entre o cromóforo aromático da base ligante e pares de DNA (KELLY et al., 1985; CHOW & BARTON, 1992).

Diferentes tipos de corantes usados no setor alimentício são também utilizados pelas indústrias farmacêuticas, têxteis, automotivas ou químicas. Como consequência, durante os processos de fabricação, parte destes corantes é perdida e frequentemente ocasionam problemas ambientais (RIGONI, 2006).

2.4. Legislação

A legislação para aditivos alimentares e conseqüentemente corantes surgiu da necessidade de controlar o uso destas substâncias, uma vez que a sua utilização pela indústria de alimentos é cada vez mais comum. A legislação que regulamenta o uso de aditivos em alimentos destinados a humanos já está bem definida no Brasil, Estados Unidos e nos países da União Européia, porém, em se tratando da regulamentação de aditivos em alimentos destinados a alimentação de animais, ainda é escassa.

A regulamentação brasileira para aditivos foi estabelecida primeiramente pelo Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, o qual dispunha sobre as normas técnicas especiais reguladoras do emprego de aditivos químicos em alimentos, sendo alterado pelo Decreto nº 691, de 1962 e posteriormente pelo Decreto nº 55.871 de março de 1965 (BRASIL, 1965) o último vigente até a presente data. Após o estabelecimento do decreto de nº 55.871, várias atualizações foram realizadas como a Resolução nº 44 de 1977, a qual estabeleceu as condições de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas; a Portaria nº 2 de 1987, a qual excluiu os corantes Amarelo Ácido ou Amarelo Sólido (13015), Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina (69800), Laranja GGN (15980), Vermelho Sólido E (16045), e Escarlate GN (14815) para uso em alimentos; as Resoluções nº 382 e 388, de 1999, onde são mencionados 11 corantes permitidos no Brasil para alimentos e bebidas (PRADO & GODOY, 2003).

No Brasil, a permissão para o uso, e a determinação dos níveis máximos toleráveis de corantes utilizados em alimentos é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Saúde (MS), que realizam atividades de inspeção através do Comitê Permanente em Aditivos Alimentares (CPAA) (FÁVERO et al., 2011).

Em se tratando da regulamentação para alimentos destinados a animais, não existe legislação específica no Brasil, porém, a Portaria nº 384, de 2003 e a Instrução Normativa nº 13 de 2004 fazem menção ao regulamento técnico sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização de aditivos para alimentação animal e regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2003). Logo as regulamentações pertinentes a corantes utilizados em alimentos destinados a humanos são extrapoladas para animais (BRASIL, 1965; 2003).

Atualmente o que se verifica na literatura é que os dados e regulamentações utilizadas para humanos são extrapoladas para animais, sem considerar que a frequência e o tipo de alimentos administrados para animais são diferentes dos consumidos por humanos.

As Instruções Normativas nº 3; nº 30 e nº 66 do ano de 2009 contemplam os regulamentos técnicos para procedimentos de registro de estabelecimentos e produtos destinados para animais (BRASIL, 2009ab).

Em se tratando de alimentos para o consumo animal, de acordo com a legislação, aditivos sensoriais, como os corantes, e tecnológicos, constantes na formulação dos produtos devem ser declarados na composição básica (BRASIL, 2009b). É observado que nas regulamentações para alimentos para animais não se especificam quais as substâncias permitidas, LMP (Limite Máximo Permitido) ou IDA para as espécies específicas. Dessa forma, subtede-se que as regulamentações para animais são oriundas daquelas para humanos.

Os Estados Unidos que chegaram a ter, no início do século XX, mais de 700 substâncias com poder corante, reduziu a quantidade de corantes sintéticos permitidos em alimentos para nove, sendo dois de uso restrito (FDA, 2007). No Japão, segundo a legislação, permite-se o uso de 11 corantes sintéticos. Com a criação da União Européia, houve a necessidade de uma harmonização das legislações dos países membros. Assim, foram elaboradas as diretrizes que controlam o uso de aditivos em alimentos, sendo as que englobam os corantes são as diretrizes 94/36/EC e a 95/45/EC. Atualmente 17 corantes artificiais são permitidos na União Européia para uso em alimentos e bebidas. Cabe destacar que alguns países, como a Noruega e Suécia, proíbem o uso de corantes artificiais nos alimentos (QUADRO 1) (EC, 1994; 1999; 2003).

No caso da União Européia a legislação para aditivos em alimentos destinados para animais é determinada pelos regulamentos (EC, 2003) nº 1831/2003 e diretiva 2003/7/EC, sendo que estes determinam as normas para o uso dos aditivos na nutrição animal, bem como determinam os procedimentos para autorização, venda, e a rotulagem desses produtos. De acordo com tal diretiva, as substâncias corantes pertencem ao grupo assim chamado de aditivos sensoriais, sendo as substâncias que melhoram ou mudam as propriedades organolépticas da alimentação ou as características visuais do alimento destinado ao animal. Este regulamento descreve nove xantofilas que podem ser adicionados à alimentação animal. A cantaxantina é permitida como um aditivo para a alimentação de animais de companhia como cães, gatos, peixes e pássaros ornamentais (BREITHAUPT, 2007; EC, 2003; 2010).

Em todo o mundo, o controle da utilização de corantes em alimentos baseia-se na IDA, ou seja, um valor numérico que determina a quantidade que se pode consumir de uma

determinada substância, diariamente e por toda a vida, que não apresenta riscos à saúde humana, dentro dos conhecimentos atuais, estando sujeitos a alterações contínuas, dependendo dos resultados toxicológicos. A IDA de um determinado corante é estabelecida segundo resultados de pesquisas internacionais e recomendações do Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes (CCFAC) (BESSONOV et al., 2011).

O corante tartrazina, por exemplo, foi avaliado toxicologicamente pelo JECFA, com enfoque em análise de risco. O JECFA determinou a IDA numérica de 7,5 mg/kg-1 de peso corpóreo. Isso significa, por exemplo, que uma criança de 30kg e um adulto de 60kg podem consumir até 225 mg e 450 mg de tartrazina por dia, respectivamente, sem risco provável à saúde, à luz dos conhecimentos disponíveis na época da avaliação (ABIMA, 2007).

Apesar do controle exigido pelas agências reguladoras, a utilização de corantes em alimentos continua levantando uma série de dúvidas quanto à sua citotoxicidade, uma vez que, na literatura, há uma escassez de trabalhos avaliando a toxicidade destes compostos (FENG et al., 2012). De acordo com Rutkunas et al. (2010), a ação destes compostos a nível celular, deve ser avaliada em vários organismos de teste, como em mamíferos, plantas, insetos e em culturas de células *in vitro*, de modo a medir com precisão a sua real toxicidade (IGANCI et al., 2006).

Quadro 1 - Uso dos quatro azo corantes artificiais abordados, em alguns países

Corante	Estados Unidos	Canadá	Japão	JECFA	União Européia
Ponceau 4R	Proibido	-	Permitido ¹	Permitido	Permitido ¹
Tartrazina	Permitido	Permitido	-	Permitido	Permitido
Amarelo Crepúsculo	Permitido	Permitido ²	-	Permitido	Permitido
Vermelho 40	Permitido	Permitido	Permitido	-	Permitido

¹ Voluntariamente banido pelas indústrias de alimentos na região.

² Em produtos específicos e numa concentração máxima de 300 ppm (partes por milhão).

Fonte: Adaptado (PRADO & GODOY, 2003).

Os rótulos dos alimentos coloridos artificialmente devem constar a observação "COLORIDO ARTIFICIALMENTE" e terem relacionado nos ingredientes o nome completo do corante ou seu número de INS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO, 2001).

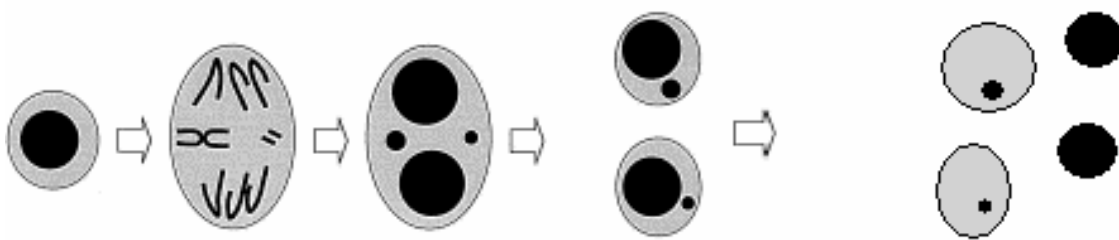
2.5. Teste do Micronúcleo

O Teste do Micronúcleo foi desenvolvido por Matter & Schmid (1971), tendo sido melhorado alguns anos depois (SCHMID, 1975). O ensaio foi desenvolvido primeiramente em sistema *in vivo*, em células de medula óssea de camundongos, e posteriormente teve a versão *in vitro* introduzida por Heddle, em 1976. Atualmente é aplicado em vários tipos celulares. O teste é amplamente recomendado para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (HAYASHI et al., 1994; CHOY, 2001; SBMCTA, 2005; OECD, 2007).

É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH et al., 1999).

O micronúcleo (MN) se expressa em células em divisão, como resultado de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou como consequência de cromossomos inteiros que não se prenderam ao fuso mitótico e dessa forma não chegam aos pólos das células durante a mitose ou a meiose. Na telófase, estes fragmentos ou cromossomos inteiros são encapsulados em um pequeno núcleo separado, daí o termo MN (FIG. 3). Assim, o MN representa tanto uma alteração cromossômica estrutural, como uma alteração numérica (SALVADORI et al., 2003).

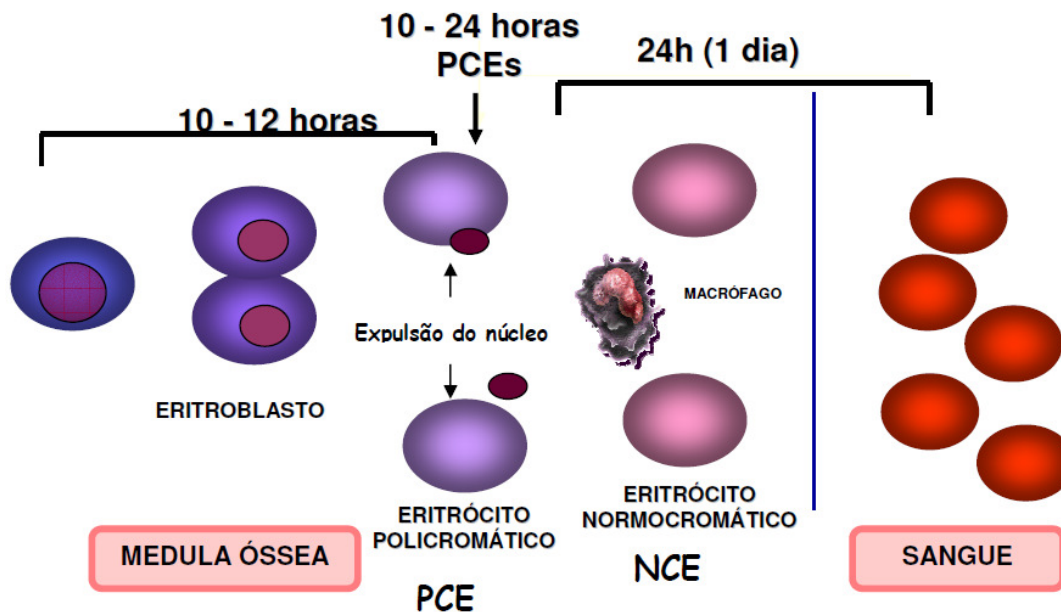
Figura 3 - Formação do micronúcleo em células da linhagem eritrocitária



Agentes genotóxicos induzem a formação de quebras ou a não-disjunção dos cromossomos nas células e estes fragmentos, ou cromossomo inteiro, não se prendem ao fuso de divisão e são encapsulados em um pequeno núcleo separado. O núcleo é expulso e o MN permanece no citoplasma da célula. Fonte: Ribeiro (2006).

Durante a maturação das células da linhagem eritrocitária na medula óssea, o núcleo principal é expulso do eritrócito nucleado, enquanto os MN ficam retidos. Estes pequenos núcleos são analisados principalmente em eritrócitos policromáticos (PCEs, eritrócitos jovens) (FIG. 4).

Figura 4 - Formação dos Eritrócitos Policromáticos (PCE) e Normocromáticos (NCE) na medula óssea



O eritroblasto, durante seu processo de maturação, dá origem ao eritrócito policromático, eritrócito imaturo no qual o núcleo foi expulso, que sofre maturação transformando-se em eritrócito normocromático (maduro) que atinge a corrente sanguínea. Fonte: Ribeiro (2006).

Na técnica do MN em medula óssea de roedores a avaliação do número de células micronucleadas é obtida através da contagem de PCE e NCE. Também é feita a avaliação da relação PCE/NCE (HEDDLE, 1981; TITENKO-HOLLAND et al., 1997). Diminuição na proporção de eritrócitos imaturos (PCE) reflete em uma diminuição na relação PCE/NCE, dessa forma essa relação é um parâmetro de citotoxicidade ou depressão celular (SHAHIM et al., 2006). Os MNs são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito e correspondem ao que se denomina, em hematologia, de Corpúsculos de Howell-Jolly. A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos é baixa e consistente, cerca de 3 micronúcleos por 1000 células analisadas (RABELLO-GAY et al., 1991).

O teste do MN em medula óssea de roedores é bastante usado para a detecção de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que interferem nas fibras do fuso. O teste se caracteriza pela observação do efeito do agente testado em PCE anucleados, que têm vida curta, e qualquer MN encontrado representa dano cromossômico recente. Por ser de fácil identificação e ter distribuição bem definida, os resultados obtidos com o teste *in vivo* do MN fornecem fortes evidências da genotoxicidade sistêmica do composto químico avaliado sob condições experimentais apropriadas (SALVADORI et al., 2003).

Diversos estudos comprovaram a eficácia do teste do MN como indicador de danos citogenéticos em células cancerígenas. Aumento da frequência de MN é indicativo de elevação das taxas de mutações, o que está relacionado ao desenvolvimento de carcinomas (CARVALHO et al., 2002). A medida da frequência de MN em linfócitos do sangue periférico é extensivamente usada em epidemiologia molecular e em citogenética para avaliar a presença e a extensão dos danos cromossômicos nas populações humanas expostas a agentes genotóxicos ou com um perfil genético susceptível. A alta confiabilidade e o baixo custo da técnica contribuem para o sucesso mundial e adoção desse biomarcador para estudos *in vitro* e *in vivo* de danos genéticos (BONASSI et al., 2007).

Segundo Boriollo et al. (2008), há paridade qualitativa dos ensaios realizados com PCEs e NCEs provenientes da medula óssea e sangue periférico, o que sugere ausência de restrição para os ensaios do micronúcleo empregando roedores *in vivo* (camundongos *Swiss albinus*).

O ensaio do micronúcleo tem sido amplamente usado para medir genotoxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O teste *in vivo* é especialmente relevante porque permite obter maiores informações sobre as condições experimentais, tais como o metabolismo, a farmacocinética e os processos de reparo do DNA. É usado primeiro para avaliar a habilidade da substância teste para induzir danos cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores (KRISHNA & HAYASHI, 2000).

Boriollo et al. (2014), utilizou o ensaio MN, *in vivo*, como potencial biomarcador, para avaliar o efeito mutagênico (clastogenicidade e/ou aneugenicidade) e atividade antimutagênica de um extrato da casca de *Z. Joazeiro*.

Os eventos que levam à formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos checkpoints do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (BONASSI et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Corantes azóicos

Os seguintes corantes azóicos foram adquiridos comercialmente e armazenados à temperatura ambiente em local seco e escuro, de acordo com as recomendações do fabricante (Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul, SC, Brasil.):

- Red 40 E-129 [dissódico 6-hidroxi-5 - ((2-metoxi-5-metil 4-sulfofenil) azo) -2-sulfonato de naftaleno] (CAS 25956-17-6);
- Ponceau-4R E-124 [trissódico (8Z) -7-oxo-8 - [(4-sulfonato-naftalen-1-il) hydrazinylidene] naftaleno-1,3-dissulfonato] (CAS 2611-82-7);
- Tartrazina E-102 [trissódico (4E) -5-oxo-1- (4-sulfonatofenil) -4 - [(4-sulfonato fenil) hidrazono] - carboxilato de 3-pirazole] (CAS 1934-21-0);
- Amarelo crepúsculo E-110 [dissódico 6-hidroxi-5 - [(4-sulfofenil) azo] -2-naftalenossulfonato] (CAS 2783-94-0).

Os corantes azóicos foram preparados em solvente aquoso (água tipo 1) em concentrações de 1×, esterilizado por filtração (Millipore Corporation, Durapore® hidrofílica PVDF, 0,22 µm, 47Ø mm, cat. # 047 GVWP 00), e armazenados em tubos estéreis de polipropileno (50 mL) a -70C° até o momento da utilização.

3.2. Sistema - Teste *in vivo*

Foram utilizados 168 (cento e sessenta e oito) camundongos da espécie *Swiss albinus*, saudáveis, heterogêneos, adultos jovens, machos e fêmeas (Unib: SW), com idade entre 7 e 12 semanas (período púbere), com um peso entre 30 e 40g (ou seja, a variação de peso entre os animais, para cada sexo, não excedeu $\pm 20\%$). Estes animais foram fornecidos pela CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência dos animais de Laboratório - UNICAMP; <http://www.cemib.unicamp.br>).

Os eritrócitos da medula óssea destes camundongos foram utilizados no ensaio de micronúcleo (CSGMT, 1986; OECD, 1997c; KRISHNA & HAYASHI, 2000). Os animais

foram mantidos em grupos do mesmo sexo, em caixas de polipropileno, num ambiente climatizado a $22\text{C}^{\circ} \pm 3\text{C}^{\circ}$, com a umidade relativa do ar de $50\% \pm 20\%$, e com os ciclos dia/noite de 12 horas (ou seja, a luz 12h e 12h escuro). Estes foram alimentados com rações comerciais Labina Purina® (*Nestlé Purina Pet Care Company*) e água ad libitum, aclimatados às condições laboratoriais durante 7 dias (um período de teste) antes da execução do experimento. No final do período de teste, cada animal foi pesado e, de acordo com o peso, recebeu $2\text{mL} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de peso corporal do líquido indicado (controle negativo e controle positivo). Após o tratamento experimental os animais foram eutanasiados com CO_2 em câmaras de acrílico adaptadas (KRISHNA & HAYASHI, 2000).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UNIFENAS (CEPEAU Protocolo n.º 08A/2014) e realizada na UNIFENAS, campus Alfenas/MG.

3.3 Grupos Experimentais

Cinquenta e seis grupos de animais (constituídos por 3 machos e 3 fêmeas, cada um) foram tratados utilizando um único regime de dosagem administrada por sonda esofágica (corantes azóicos e controle negativo) ou intraperitoneal (controle positivo) e dois tempos de eutanásia (24h e 48h), com base em recomendação sobre o ensaio *in vivo* de micronúcleos (CSGMT, 1986; OECD, 1997c; KRISHNA & HAYASHI, 2000; BORIOLLO et al., 2014ab):

- Grupos controle: 150 mM NaCl (controle negativo), $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de N-Nitroso-N-ethylurea (controle positivo: NEU, Sigma N8509, CAS no. 759-73-9) e $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de doxorubicin hydrochloride (VENKATESH et al., 2007; BORIOLLO et al., 2014ab) (quimioterapêutico: DXR, Eurofarma Laboratórios Ltda., CAS no. 23214-92-8).
- Teste de genotoxicidade (corantes azóicos): Vermelho 40 E-129 (1g, 1,5g e $2\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$), Ponceau 4R E-124 (1, 1,5 e $2 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$), Tartrazine E-102 (1, 1,5 e $2 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$) e Sunset Yellow E-110 (1, 1,5 e $2 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$). A dose máxima tolerada (MTD) foi definida como (i) a dose mais alta que pode ser administrada sem induzir letalidade ou toxicidade excessiva durante o estudo causando a eutanásia, ou (ii) uma dose que produz algumas indicações de toxicidade da medula óssea (por exemplo, uma redução na proporção de eritrócitos imaturos entre eritrócitos totais na medula óssea), ou (iii) $2 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (OECD, 1997c; KRISHNA & HAYASHI, 2000).

3.4. Processamento da medula óssea e análise de células

Pouco tempo após a eutanásia, os fêmures foram removidos cirurgicamente e de forma asséptica e os animais apropriadamente descartados. Cada fêmur foi seccionado na extremidade proximal e o conteúdo do canal espinal foi lavado com 1,5 mL de solução NaCl 150 mM e transferido para um tubo de 15 mL em centrífuga (ZAMBRANO et al., 1982; OECD, 1997c; KRISHNA & HAYASHI, 2000). Este material foi ressuspenso com uma pipeta de Pasteur para assegurar uma distribuição aleatória de células de medula óssea. A suspensão foi então centrifugada a 1.000 rpm [centrífuga de Bancada Microprocessada, Mod. NT 810, Nova Técnica Ind. E Com. De Equip. Para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil] por 5 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento resultante foi ressuspenso em 500µL de solução de 150 mM NaCl adicionada de 4% de formaldeído. As lâminas foram preparadas por esfregaço (duas lâminas por animal), secou-se à temperatura ambiente durante 24h e coradas com o corante *Leishman* eosina azul de metileno (corante puro por 3 minutos, seguido por um corante diluído em água tipo 1 (1: 6) para 15 min) para diferenciar eritrócitos policromáticos (PCE) de eritrócitos normocromáticos (NCE). Eritrócitos policromáticos (PCEs) foram observados com uma ampliação de 1000× usando microscopia óptica [Nikon Eclipse E-200], contados [pelo menos 2000 eritrócitos policromáticos anucleados por animal foram marcados para a incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados] com o auxílio de uma câmera digital e contador de células [Contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brasil contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brasil] e fotografada usando câmera digital de 8.1 Megapixel [DC FWL 150]. Foram relatados o número de PCE e NCE, o número e a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleadas (MNPCEs). De modo a avaliar a toxicidade para a medula óssea, a razão de PCE para NCE também foi observada (OECD, 1997c; KRISHNA & HAYASHI, 2000). Esta razão PCE/NCE é um indicador da aceleração ou inibição da eritropoiese e tem sido relatada para variar com o tempo de pontuação. Um declínio contínuo na proporção PCE/NCE pode ser devido à inibição da divisão celular, a morte de eritroblastos, a remoção de células danificadas, ou a diluição do conjunto de células com células existente recém-formados (VENKATESH et al., 2007).

3.5. Análise Estatística

Os dados obtidos no ensaio de micronúcleos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando um esquema fatorial de $5 \times 2 \times 2$ (tratamento \times sexo \times tempo), e comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) usando o programa computacional SAS[®] versão 9.3.

4 RESULTADOS

Investigações visando o conhecimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de corantes azóicos foram alvo de poucas pesquisas (SASAKI et al., 2002; MANSOUR et al., 2007; ELHKIM et al., 2007; POUL et al., 2009; MPOUNTOUKAS et al., 2010), fato este que impulsionou uma avaliação dos efeitos nocivos, sob a óptica mutagênica (i.e., clastogenicidade e/ou aneugenicidade) de quatro corantes azóicos (vermelho 40, vermelho de Ponceau, tartrazina e amarelo crepúsculo) usando o ensaio do micronúcleo (MN) *in vivo*. O ensaio de MN é utilizado para avaliar o dano cromossômico induzido por agentes mutagênicos químicos e cancerígenos (YAMAMOTO & KIKUCHI, 1980; HEDDLE et al., 1981). A formação de MN e a incidência de aberrações cromossômicas são altamente correlacionadas (HEDDLE et al., 1983; ALMASSY et al., 1987). Entre as várias técnicas utilizadas para detectar os efeitos genéticos e genotóxicos, o teste de MN é simples, barato e menos pesado e permite a aplicação conveniente e fácil, particularmente, em estudos genotóxicos (SCHMID, 1976; HEDDLE et al., 1983). A substância cancerígena N-Nitroso-N-etilureia utilizada nesse estudo como um controle positivo no ensaio de micronúcleo é um agente considerado mutagênico. Após a administração oral, o número de aberrações nucleares nas células foi consideravelmente maior quando comparado com os ratos não tratados, indicando assim, a sensibilidade do sistema de ensaio.

Os números e as frequências de MNPCs e a razão PCE/NCE na medula óssea de ratos foram analisados estatisticamente para cada um dos grupos de animais tratados com corantes azóicos (Red 40 E-129, E-124 Ponceau 4R, Tartrazina e Sunset E-102 grupos Amarelo E-110) e de controle (NaCl e NEU).

Para os grupos de animais tratados com Red 40 E-129, a análise dos MNPCs não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de tratamento (1, 1,5 e 2 g.Kg⁻¹). No entanto, foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as doses de tratamento e os grupos controle (NaCl ou NEU). Estes resultados sugerem presença de genotoxicidade do Red 40 E-129, independentemente da dose de Red 40 E-129 administrados, mas depende do sexo (masculino e feminino) e do tempo (24 e 48 h). A análise obtida a partir da razão PCE/NCE mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a dose mais baixa (1 g.Kg⁻¹) e a mais alta (2 g.Kg⁻¹) de Red 40 E-129, bem como entre os grupos controle (NaCl e NEU) e as doses de tratamento deste azocorante. Estes resultados sugerem

toxicidade sistêmica de vermelho 40 E-129 sob as condições de ensaio MN, independentemente do tempo (24h e 48h), mas sexo-dependente e dose-dependente (TAB. 3).

Para os grupos de animais tratados com Ponceau 4R E-124, a análise dos MNPCEs mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de tratamento e grupos controle (NaCl e NEU). Estes resultados sugerem a presença de genotoxicidade de Ponceau 4R E-124, independentemente do sexo do animal (macho e fêmea), mas dependente do tempo (24 e 48h) e dependente da dose (1, 1,5 e 2 g.Kg⁻¹). A análise obtida a partir da relação PCE/NCE não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de Ponceau 4R E-124. No entanto, foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos controle (NaCl e NEU) e as doses de tratamento deste azocorante. Estes resultados sugerem que toxicidade sistêmica do Ponceau 4R E-124 sob as condições de ensaio MN, independentemente das doses, mas sexo-dependente e dependente do tempo (TAB. 4).

Para os grupos de animais tratados com Tartrazina E-102, a análise dos MNPCEs mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de tratamento (1, 1,5 e 2 g.Kg⁻¹), bem como entre as doses de tratamento e os grupos controle (NaCl e NEU). Estes resultados sugerem a presença de genotoxicidade de tartrazina E-102, independentemente do tempo de tratamento (24 e 48h), mas dependente do sexo (masculino e feminino) e dependente da dose (1, 1,5 e 2 g.Kg⁻¹). A análise obtida a partir da relação PCE/NCE não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de Tartrazina E-102, mas há diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos controle (NaCl e NEU) e as doses de tratamento deste azocorante. Estes resultados sugerem toxicidade sistêmica da tartrazina E-102 sob as condições de ensaio MN, independentemente da dose de administração, mas sexo-dependente (masculino e feminino) e dependente do tempo (24h e 48h) (TAB. 5).

Para os grupos de animais tratados com Amarelo Crepúsculo E-110, a análise dos MNPCEs mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de tratamento (1, 1,5, 2 g.Kg⁻¹), bem como entre as doses de tratamento e os grupos controle (NaCl e NEU). Estes resultados sugerem a presença de genotoxicidade de Amarelo crepúsculo E-110, independentemente do sexo do animal (macho e fêmea), mas dependente do tempo (24 e 48h) e dependente da dose (1, 1,5 e 2 g.Kg⁻¹). A análise obtida pela razão PCE/NCE mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a menor (1 g.Kg⁻¹) e a maior (2g.Kg⁻¹) dose de amarelo crepúsculo E-110, bem como entre os grupos controle (NaCl e NEU) e as doses de tratamento deste azocorante. Estes resultados sugerem toxicidade sistêmica do Amarelo

crepúsculo E-110 sob as condições de ensaio MN, independentemente do sexo (masculino e feminino) e do tempo (24 e 48h), mas dependente da dose (1, 1,5 e 2 g.Kg⁻¹) (TAB. 6).

Tabela 3 – Incidência de MNPCs e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Red 40^{E-129}.

Tratamento	Número de PCEs analisado		PCEMNs *		PCE / (PCE + NCE) **		NCE (n)			
	24h	48h	24h (n) ^A	48h (n) ^B	24h (%) ^{A'}	48h (%) ^{B'}	24h	48h		
<i>150 mM NaCl</i>										
♀ ₁	2048	2082	14	18	0.684	0.865	0.931	0.905	152	218
♀ ₂	2069	2077	17	17	0.822	0.818	0.900	0.831	231	423
♀ ₃	2016	2055	16	20	0.794	0.973	0.960	0.822	84	445
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6133	Σ 6214	Σ 47	Σ 55	0.766 ± 0.073	0.885 ± 0.079	0.930 ± 0.030	0.853 ± 0.046	Σ 467	Σ 1086
♂ ₁	2074	2023	18	19	0.868	0.939	0.830	0.843	426	377
♂ ₂	2071	2046	20	19	0.966	0.929	0.863	0.818	329	454
♂ ₃	2010	2009	19	22	0.945	1.095	0.874	0.773	290	591
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6155	Σ 6078	Σ 57	Σ 60	0.926 ± 0.052	0.988 ± 0.093	0.855 ± 0.023	0.811 ± 0.036	Σ 1045	Σ 1422
Σ ♂ and ♀	Σ 12288	Σ 12292	Σ 104 ^A	Σ 115 ^A	0.846 ± 0.104 ^{A'}	0.937 ± 0.096 ^{A'}	0.893 ± 0.047 ^{A''}	0.832 ± 0.043 ^{A''}	Σ 1512	Σ 2508
<i>N-Nitroso-N-ethylurea – NEU (50 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2027	2025	47	52	2.319	2.568	0.548	0.553	1673	1635
♀ ₂	2071	2041	44	49	2.125	2.401	0.592	0.583	1429	1459
♀ ₃	2026	2050	42	44	2.073	2.146	0.579	0.603	1474	1350
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6124	Σ 6116	Σ 133	Σ 145	2.172 ± 0.130	2.372 ± 0.212	0.573 ± 0.023	0.580 ± 0.025	Σ 4576	Σ 4444
♂ ₁	2006	2004	44	48	2.193	2.395	0.590	0.573	1394	1496
♂ ₂	2053	2027	50	46	2.435	2.269	0.587	0.563	1447	1573
♂ ₃	2033	2039	46	52	2.263	2.550	0.581	0.551	1467	1661
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6092	Σ 6070	Σ 140	Σ 146	2.297 ± 0.125	2.405 ± 0.141	0.586 ± 0.005	0.562 ± 0.011	Σ 4308	Σ 4730
Σ ♂ and ♀	Σ 12216	Σ 12186	Σ 273 ^C	Σ 291 ^C	2.235 ± 0.133 ^{C'}	2.388 ± 0.162 ^{C'}	0.579 ± 0.016 ^{D''}	0.571 ± 0.020 ^{D''}	Σ 8884	Σ 9174
<i>Red 40 ^{E-129} (1.000 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2033	2014	26	30	1.279	1.490	0.598	0.610	1367	1286
♀ ₂	2028	2002	27	29	1.331	1.449	0.596	0.589	1372	1398
♀ ₃	2078	2004	23	29	1.107	1.447	0.649	0.573	1122	1496
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6139	Σ 6020	Σ 76	Σ 88	1.239 ± 0.117	1.462 ± 0.024	0.615 ± 0.030	0.591 ± 0.019	Σ 3861	Σ 4180
♂ ₁	2021	2013	25	25	1.237	1.242	0.612	0.629	1279	1187
♂ ₂	2050	2059	24	29	1.171	1.408	0.621	0.606	1250	1341
♂ ₃	2013	2058	30	26	1.490	1.263	0.649	0.624	1087	1242
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6084	Σ 6130	Σ 79	Σ 80	1.299 ± 0.169	1.305 ± 0.091	0.628 ± 0.019	0.619 ± 0.012	Σ 3616	Σ 3770
Σ ♂ and ♀	Σ 12223	Σ 12150	Σ 155 ^B	Σ 168 ^B	1.269 ± 0.134 ^{B'}	1.383 ± 0.105 ^{B'}	0.621 ± 0.024 ^{B''}	0.605 ± 0.021 ^{B''}	Σ 7477	Σ 7950

Red 40^{E-129} (1.500 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2074	2055	29	29	1.398	1.411	0.593	0.604	1426	1345
♀ ₂	2006	2049	27	29	1.346	1.415	0.608	0.585	1294	1451
♀ ₃	2043	2030	25	24	1.224	1.182	0.681	0.597	957	1370
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6123	Σ 6134	Σ 81	Σ 82	1.323 ±0.090	1.336 ±0.133	0.627 ±0.047	0.596 ±0.010	Σ 3677	Σ 4166
♂ ₁	2028	2043	24	33	1.183	1.615	0.676	0.619	972	1257
♂ ₂	2008	2069	27	30	1.345	1.450	0.628	0.627	1192	1231
♂ ₃	2010	2032	27	30	1.343	1.476	0.609	0.635	1290	1168
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6046	Σ 6144	Σ 78	Σ 93	1.290 ±0.093	1.514 ±0.089	0.638 ±0.035	0.627 ±0.008	Σ 3454	Σ 3656
Σ ♂ and ♀	Σ 12169	Σ 12278	Σ 159 ^B	Σ 175 ^B	1.307 ±0.083 ^{B'}	1.425 ±0.140 ^{B'}	0.632 ±0.037 ^{BC''}	0.611 ±0.019 ^{BC''}	Σ 7131	Σ 7822

Red 40^{E-129} (2.000 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2047	2053	24	32	1.172	1.559	0.660	0.622	1053	1247
♀ ₂	2028	2095	27	31	1.331	1.480	0.634	0.655	1172	1105
♀ ₃	2060	2044	26	29	1.262	1.419	0.644	0.601	1140	1356
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6135	Σ 6192	Σ 77	Σ 92	1.255 ±0.080	1.486 ±0.070	0.646 ±0.013	0.626 ±0.027	Σ 3365	Σ 3708
♂ ₁	2056	2068	33	31	1.605	1.499	0.643	0.627	1144	1232
♂ ₂	2024	2001	32	29	1.581	1.449	0.633	0.645	1176	1099
♂ ₃	2035	2016	27	33	1.327	1.637	0.656	0.630	1065	1184
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6115	Σ 6085	Σ 92	Σ 93	1.504 ±0.154	1.528 ±0.097	0.644 ±0.012	0.634 ±0.010	Σ 3385	Σ 3515
Σ ♂ and ♀	Σ 12250	Σ 12277	Σ 169 ^B	Σ 185 ^B	1.380 ±0.175 ^{B'}	1.507 ±0.079 ^{B'}	0.645 ±0.011 ^{C''}	0.630 ±0.019 ^{C''}	Σ 6750	Σ 7223

As letras A, B, C e D correspondem à escala padronizada de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Incidência de MNPCs e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Ponceau 4R^{E-124}.

Tratamento	Número de PCEs analisado		PCEMNs *		PCE / (PCE + NCE) **		NCE (n)			
	24h	48h	24h (n) ^A	48h (n) ^B	24h (%) ^{A'}	48h (%) ^{B'}	24h	48h		
<i>150 mM NaCl</i>										
♀ ₁	2048	2082	14	18	0.684	0.865	0.931	0.905	152	218
♀ ₂	2069	2077	17	17	0.822	0.818	0.900	0.831	231	423
♀ ₃	2016	2055	16	20	0.794	0.973	0.960	0.822	84	445
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6133	Σ 6214	Σ 47	Σ 55	0.766 ± 0.073	0.885 ± 0.079	0.930 ± 0.030	0.853 ± 0.046	Σ 467	Σ 1086
♂ ₁	2074	2023	18	19	0.868	0.939	0.830	0.843	426	377
♂ ₂	2071	2046	20	19	0.966	0.929	0.863	0.818	329	454
♂ ₃	2010	2009	19	22	0.945	1.095	0.874	0.773	290	591
Σ ♂ ^{A* B**}	Σ 6155	Σ 6078	Σ 57	Σ 60	0.926 ± 0.052	0.988 ± 0.093	0.855 ± 0.023	0.811 ± 0.036	Σ 1045	Σ 1422
Σ ♂ and ♀	Σ 12288	Σ 12292	Σ 104 ^A	Σ 115 ^A	0.846 ± 0.104 ^{A'}	0.937 ± 0.096 ^{A'}	0.893 ± 0.047 ^{A''}	0.832 ± 0.043 ^{A''}	Σ 1512	Σ 2508
<i>N-Nitroso-N-ethylurea – NEU (50 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2027	2025	47	52	2.319	2.568	0.548	0.553	1673	1635
♀ ₂	2071	2041	44	49	2.125	2.401	0.592	0.583	1429	1459
♀ ₃	2026	2050	42	44	2.073	2.146	0.579	0.603	1474	1350
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6124	Σ 6116	Σ 133	Σ 145	2.172 ± 0.130	2.372 ± 0.212	0.573 ± 0.023	0.580 ± 0.025	Σ 4576	Σ 4444
♂ ₁	2006	2004	44	48	2.193	2.395	0.590	0.573	1394	1496
♂ ₂	2053	2027	50	46	2.435	2.269	0.587	0.563	1447	1573
♂ ₃	2033	2039	46	52	2.263	2.550	0.581	0.551	1467	1661
Σ ♂ ^{A* B**}	Σ 6092	Σ 6070	Σ 140	Σ 146	2.297 ± 0.125	2.405 ± 0.141	0.586 ± 0.005	0.562 ± 0.011	Σ 4308	Σ 4730
Σ ♂ and ♀	Σ 12216	Σ 12186	Σ 273 ^E	Σ 291 ^E	2.235 ± 0.133 ^{E'}	2.388 ± 0.162 ^{E'}	0.579 ± 0.016 ^{C''}	0.571 ± 0.020 ^{C''}	Σ 8884	Σ 9174
<i>Ponceau 4R^{E-124} (1.000 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2049	2047	24	27	1.171	1.319	0.640	0.620	1151	1253
♀ ₂	2059	2027	25	30	1.214	1.480	0.624	0.633	1241	1173
♀ ₃	2048	2041	28	25	1.367	1.225	0.602	0.618	1352	1259
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6156	Σ 6115	Σ 77	Σ 82	1.251 ± 0.103	1.341 ± 0.129	0.622 ± 0.019	0.624 ± 0.008	Σ 3744	Σ 3685
♂ ₁	2062	2069	24	25	1.164	1.208	0.644	0.609	1138	1331
♂ ₂	2012	2062	23	30	1.143	1.455	0.651	0.644	1080	1138
♂ ₃	2045	2011	25	28	1.222	1.392	0.660	0.609	1055	1289
Σ ♂ ^{A* B**}	Σ 6119	Σ 6142	Σ 72	Σ 83	1.177 ± 0.041	1.352 ± 0.128	0.652 ± 0.008	0.621 ± 0.020	Σ 3273	Σ 3758
Σ ♂ and ♀	Σ 12275	Σ 12257	Σ 149 ^B	Σ 165 ^B	1.214 ± 0.081 ^{B'}	1.347 ± 0.115 ^{B'}	0.637 ± 0.021 ^{B''}	0.622 ± 0.014 ^{B''}	Σ 7017	Σ 7443

Ponceau 4R^{E-124} (1.500 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2033	2055	33	26	1.623	1.265	0.635	0.685	1167	945
♀ ₂	2017	2057	31	28	1.537	1.361	0.630	0.605	1183	1343
♀ ₃	2055	2055	30	27	1.460	1.314	0.642	0.623	1145	1245
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6105	Σ 6167	Σ 94	Σ 81	1.540 ±0.082	1.313 ±0.048	0.636 ±0.006	0.638 ±0.042	Σ 3495	Σ 3533
♂ ₁	2052	2048	28	33	1.365	1.611	0.662	0.621	1048	1252
♂ ₂	2026	2049	28	35	1.382	1.708	0.614	0.585	1274	1451
♂ ₃	2049	2066	28	32	1.367	1.549	0.603	0.608	1351	1334
Σ ♂ ^{A* B**}	Σ 6127	Σ 6163	Σ 84	Σ 100	1.371 ±0.010	1.623 ±0.080	0.626 ±0.031	0.605 ±0.018	Σ 3673	Σ 4037
Σ ♂ and ♀	Σ 12232	Σ 12330	Σ 178 ^C	Σ 181 ^C	1.456 ±0.106 ^C	1.468 ±0.179 ^C	0.631 ±0.021 ^{B''}	0.621 ±0.034 ^{B''}	Σ 7168	Σ 7570

Ponceau 4R^{E-124} (2.000 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2096	2038	34	36	1.622	1.766	0.655	0.637	1104	1162
♀ ₂	2008	2087	34	36	1.693	1.725	0.628	0.652	1192	1113
♀ ₃	2052	2151	31	36	1.511	1.674	0.586	0.672	1448	1049
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6156	Σ 6276	Σ 99	Σ 108	1.609 ±0.092	1.722 ±0.046	0.623 ±0.035	0.654 ±0.018	Σ 3744	Σ 3324
♂ ₁	2001	2052	31	37	1.549	1.803	0.606	0.604	1299	1348
♂ ₂	2050	2089	32	33	1.561	1.580	0.586	0.614	1450	1311
♂ ₃	2032	2029	33	35	1.624	1.725	0.598	0.615	1368	1271
Σ ♂ ^{A* B**}	Σ 6083	Σ 6170	Σ 96	Σ 105	1.578 ±0.040	1.703 ±0.113	0.597 ±0.010	0.611 ±0.006	Σ 4117	Σ 3930
Σ ♂ and ♀	Σ 12239	Σ 12446	Σ 195 ^D	Σ 213 ^D	1.593 ±0.066 ^{D'}	1.712 ±0.078 ^{D'}	0.610 ±0.027 ^{B''}	0.632 ±0.026 ^{B''}	Σ 7861	Σ 7254

As letras A, B, C e D correspondem à escala padronizada de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Incidência de MNPCs e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Tartrazina^{E-102}.

Tratamento	Número de PCEs analisado		PCEMNs *		PCE / (PCE + NCE) **		NCE (n)			
	24h	48h	24h (n) ^A	48h (n) ^A	24h (%) ^{A'}	48h (%) ^{A'}	24h ^{A''}	48h ^{B''}	24h	48h
<i>150 mM NaCl</i>										
♀ ₁	2048	2082	14	18	0.684	0.865	0.931	0.905	152	218
♀ ₂	2069	2077	17	17	0.822	0.818	0.900	0.831	231	423
♀ ₃	2016	2055	16	20	0.794	0.973	0.960	0.822	84	445
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6133	Σ 6214	Σ 47	Σ 55	0.766 ± 0.073	0.885 ± 0.079	0.930 ± 0.030	0.853 ± 0.046	Σ 467	Σ 1086
♂ ₁	2074	2023	18	19	0.868	0.939	0.830	0.843	426	377
♂ ₂	2071	2046	20	19	0.966	0.929	0.863	0.818	329	454
♂ ₃	2010	2009	19	22	0.945	1.095	0.874	0.773	290	591
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6155	Σ 6078	Σ 57	Σ 60	0.926 ± 0.052	0.988 ± 0.093	0.855 ± 0.023	0.811 ± 0.036	Σ 1045	Σ 1422
Σ ♂ and ♀	Σ 12288	Σ 12292	Σ 104 ^A	Σ 115 ^A	0.846 ± 0.104 ^{A'}	0.937 ± 0.096 ^{A'}	0.893 ± 0.047 ^{A''}	0.832 ± 0.043 ^{A''}	Σ 1512	Σ 2508
<i>N-Nitroso-N-ethylurea – NEU (50 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2027	2025	47	52	2.319	2.568	0.548	0.553	1673	1635
♀ ₂	2071	2041	44	49	2.125	2.401	0.592	0.583	1429	1459
♀ ₃	2026	2050	42	44	2.073	2.146	0.579	0.603	1474	1350
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6124	Σ 6116	Σ 133	Σ 145	2.172 ± 0.130	2.372 ± 0.212	0.573 ± 0.023	0.580 ± 0.025	Σ 4576	Σ 4444
♂ ₁	2006	2004	44	48	2.193	2.395	0.590	0.573	1394	1496
♂ ₂	2053	2027	50	46	2.435	2.269	0.587	0.563	1447	1573
♂ ₃	2033	2039	46	52	2.263	2.550	0.581	0.551	1467	1661
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6092	Σ 6070	Σ 140	Σ 146	2.297 ± 0.125	2.405 ± 0.141	0.586 ± 0.005	0.562 ± 0.011	Σ 4308	Σ 4730
Σ ♂ and ♀	Σ 12216	Σ 12186	Σ 273 ^D	Σ 291 ^D	2.235 ± 0.133 ^{D'}	2.388 ± 0.162 ^{D'}	0.579 ± 0.016 ^{C''}	0.571 ± 0.020 ^{C''}	Σ 8884	Σ 9174
<i>Tartrazine^{E-102} (1.000 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2001	2067	27	23	1.349	1.113	0.667	0.738	999	733
♀ ₂	2016	2037	26	22	1.290	1.080	0.672	0.702	984	863
♀ ₃	2038	2064	30	26	1.472	1.260	0.637	0.712	1162	836
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6055	Σ 6168	Σ 83	Σ 71	1.370 ± 0.093	1.151 ± 0.096	0.659 ± 0.019	0.717 ± 0.019	Σ 3145	Σ 2432
♂ ₁	2027	2023	33	29	1.628	1.434	0.614	0.749	1273	677
♂ ₂	2034	2030	28	29	1.377	1.429	0.616	0.725	1266	770
♂ ₃	1908	2012	27	27	1.415	1.342	0.596	0.805	1292	488
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 5969	Σ 6065	Σ 88	Σ 85	1.473 ± 0.135	1.401 ± 0.051	0.609 ± 0.011	0.760 ± 0.041	Σ 3831	Σ 1935
Σ ♂ and ♀	Σ 12024	Σ 12233	Σ 171 ^B	Σ 156 ^B	1.422 ± 0.118 ^{B'}	1.276 ± 0.153 ^{B'}	0.634 ± 0.031 ^{B''}	0.739 ± 0.037 ^{B''}	Σ 6976	Σ 4367

Tartrazine^{E-102} (1.500 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2068	2059	23	28	1.112	1.360	0.689	0.710	932	841
♀ ₂	2065	2011	25	31	1.211	1.542	0.738	0.670	735	989
♀ ₃	2075	2052	27	28	1.301	1.365	0.669	0.708	1025	848
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6208	Σ 6122	Σ 75	Σ 87	1.208 ±0.095	1.422 ±0.104	0.699 ±0.035	0.696 ±0.022	Σ 2692	Σ 2678
♂ ₁	2020	2046	29	31	1.436	1.515	0.652	0.660	1080	1054
♂ ₂	2060	2028	30	31	1.456	1.529	0.710	0.699	840	872
♂ ₃	2033	2052	32	33	1.574	1.608	0.616	0.641	1267	1148
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6113	Σ 6126	Σ91	Σ95	1.489 ±0.075	1.551 ±0.050	0.659 ±0.048	0.667 ±0.030	Σ 3187	Σ 3074
Σ ♂ and ♀	Σ 12321	Σ 12248	Σ 166 ^B	Σ 182 ^B	1.348 ±0.172 ^{B'}	1.486 ±0.101 ^{B'}	0.679 ±0.043 ^{B''}	0.681 ±0.028 ^{B''}	Σ 5879	Σ 5752

Tartrazine^{E-102} (2.000 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2031	2049	35	30	1.723	1.464	0.655	0.640	1069	1151
♀ ₂	2026	2041	31	29	1.530	1.421	0.633	0.756	1174	659
♀ ₃	2016	2077	32	33	1.587	1.589	0.650	0.692	1084	923
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6073	Σ 6167	Σ 98	Σ 92	1.614 ±0.099	1.491 ±0.087	0.646 ±0.012	0.696 ±0.058	Σ 3327	Σ 2733
♂ ₁	2006	2036	33	30	1.645	1.473	0.608	0.702	1294	864
♂ ₂	2063	2053	35	35	1.697	1.705	0.625	0.662	1237	1047
♂ ₃	2005	2021	34	33	1.696	1.633	0.668	0.674	995	979
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6074	Σ 6110	Σ 102	Σ 98	1.679 ±0.030	1.604 ±0.118	0.634 ±0.031	0.679 ±0.021	Σ 3526	Σ 2890
Σ ♂ and ♀	Σ 12147	Σ 12277	Σ 200 ^C	Σ 190 ^C	1.646 ±0.075 ^{C'}	1.547 ±0.112 ^{C'}	0.640 ±0.022 ^{B''}	0.688 ±0.040 ^{B''}	Σ 6853	Σ 5623

As letras A, B, C e D correspondem à escala padronizada de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Incidência de MNPCs e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Amarelo crespúsculo^{E-110}.

Tratamento	Número de PCEs analisado		MNPCEs *		PCE / (PCE + NCE)**		NCE (n)			
	24h	48h	24h (n) ^A	48h (n) ^B	24h (%) ^{A'}	48h (%) ^{B'}	24h ^{A''}	48h ^{A''}	24h	48h
<i>150 mM NaCl</i>										
♀ ₁	2048	2082	14	18	0.684	0.865	0.931	0.905	152	218
♀ ₂	2069	2077	17	17	0.822	0.818	0.900	0.831	231	423
♀ ₃	2016	2055	16	20	0.794	0.973	0.960	0.822	84	445
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6133	Σ 6214	Σ 47	Σ 55	0.766 ±0.073	0.885 ±0.079	0.930 ±0.030	0.853 ±0.046	Σ 467	Σ 1086
♂ ₁	2074	2023	18	19	0.868	0.939	0.830	0.843	426	377
♂ ₂	2071	2046	20	19	0.966	0.929	0.863	0.818	329	454
♂ ₃	2010	2009	19	22	0.945	1.095	0.874	0.773	290	591
Σ ♂ ^{A* A**}	Σ 6155	Σ 6078	Σ 57	Σ 60	0.926 ±0.052	0.988 ±0.093	0.855 ±0.023	0.811 ±0.036	Σ 1045	Σ 1422
Σ ♂ and ♀	Σ 12288	Σ 12292	Σ 104 ^A	Σ 115 ^A	0.846 ±0.104 ^{A'}	0.937 ±0.096 ^{A'}	0.893 ±0.047 ^{A''}	0.832 ±0.043 ^{A''}	Σ 1512	Σ 2508
<i>N-Nitroso-N-ethylurea – NEU (50 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2027	2025	47	52	2.319	2.568	0.548	0.553	1673	1635
♀ ₂	2071	2041	44	49	2.125	2.401	0.592	0.583	1429	1459
♀ ₃	2026	2050	42	44	2.073	2.146	0.579	0.603	1474	1350
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6124	Σ 6116	Σ 133	Σ 145	2.172 ±0.130	2.372 ±0.212	0.573 ±0.023	0.580 ±0.025	Σ 4576	Σ 4444
♂ ₁	2006	2004	44	48	2.193	2.395	0.590	0.573	1394	1496
♂ ₂	2053	2027	50	46	2.435	2.269	0.587	0.563	1447	1573
♂ ₃	2033	2039	46	52	2.263	2.550	0.581	0.551	1467	1661
Σ ♂ ^{A* A**}	Σ 6092	Σ 6070	Σ 140	Σ 146	2.297 ±0.125	2.405 ±0.141	0.586 ±0.005	0.562 ±0.011	Σ 4308	Σ 4730
Σ ♂ and ♀	Σ 12216	Σ 12186	Σ 273 ^E	Σ 291 ^E	2.235 ±0.133 ^{E'}	2.388 ±0.162 ^{E'}	0.579 ±0.016 ^{D''}	0.571 ±0.020 ^{D''}	Σ 8884	Σ 9174
<i>Sunset Yellow^{E-110} (1.000 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2038	2023	20	21	0.981	1.038	0.703	0.698	862	877
♀ ₂	2019	2031	23	23	1.139	1.132	0.721	0.725	781	769
♀ ₃	2010	2066	25	22	1.244	1.065	0.693	0.666	890	1034
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6067	Σ 6120	Σ 68	Σ 66	1.121 ±0.132	1.078 ±0.049	0.706 ±0.014	0.696 ±0.029	Σ 2533	Σ 2680
♂ ₁	2036	2026	24	25	1.179	1.234	0.702	0.675	864	974
♂ ₂	2037	2065	24	27	1.178	1.308	0.679	0.666	963	1035
♂ ₃	2038	2001	26	26	1.276	1.299	0.679	0.667	962	999
Σ ♂ ^{A* A**}	Σ 6111	Σ 6092	Σ 74	Σ 78	1.211 ±0.056	1.280 ±0.040	0.687 ±0.013	0.669 ±0.005	Σ 2789	Σ 3008
Σ ♂ and ♀	Σ 12178	Σ 12212	Σ 142 ^B	Σ 144 ^B	1.166 ±0.103 ^{B'}	1.179 ±0.118 ^{B'}	0.696 ±0.016 ^{B''}	0.683 ±0.024 ^{B''}	Σ 5322	Σ 5688

Sunset Yellow^{E-110} (1.500 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2001	2016	27	26	1.349	1.290	0.625	0.695	1199	884
♀ ₂	2037	2043	28	34	1.375	1.664	0.617	0.704	1263	857
♀ ₃	2065	2031	26	30	1.259	1.477	0.712	0.677	835	969
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6103	Σ 6090	Σ 81	Σ 90	1.328 ±0.061	1.477 ±0.187	0.652 ±0.053	0.692 ±0.014	Σ 3297	Σ 2710
♂ ₁	2050	2010	27	29	1.317	1.443	0.641	0.670	1150	990
♂ ₂	2009	2007	29	27	1.444	1.345	0.628	0.669	1191	993
♂ ₃	2050	2036	24	27	1.171	1.326	0.683	0.702	950	864
Σ ♂ ^{A* A**}	Σ 6109	Σ 6053	Σ 80	Σ 83	1.310 ±0.137	1.371 ±0.063	0.651 ±0.029	0.680 ±0.019	Σ 3291	Σ 2847
Σ ♂ and ♀	Σ 12212	Σ 12143	Σ 161 ^C	Σ 173 ^C	1.319 ±0.095 ^{C'}	1.424 ±0.138 ^{C'}	0.651 ±0.038 ^{BC''}	0.686 ±0.016 ^{BC''}	Σ 6588	Σ 5557

Sunset Yellow^{E-110} (2.000 mg.Kg⁻¹)

♀ ₁	2026	2006	36	34	1.777	1.695	0.614	0.647	1274	1094
♀ ₂	2067	2051	28	34	1.355	1.658	0.646	0.603	1133	1349
♀ ₃	2070	2055	32	32	1.546	1.557	0.647	0.642	1130	1145
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6163	Σ 6112	Σ 96	Σ 100	1.559 ±0.211	1.637 ±0.071	0.636 ±0.019	0.631 ±0.024	Σ 3537	Σ 3588
♂ ₁	2040	2011	30	33	1.471	1.641	0.680	0.670	960	989
♂ ₂	2048	2055	31	34	1.514	1.655	0.661	0.685	1052	945
♂ ₃	2012	2058	31	33	1.541	1.603	0.649	0.686	1088	942
Σ ♂ ^{A* A**}	Σ 6100	Σ 6124	Σ 92	Σ 100	1.508 ±0.035	1.633 ±0.026	0.663 ±0.016	0.680 ±0.009	Σ 3100	Σ 2876
Σ ♂ and ♀	Σ 12263	Σ 12236	Σ 188 ^D	Σ 200 ^D	1.534 ±0.138 ^{D'}	1.635 ±0.048 ^{D'}	0.649 ±0.022 ^{C''}	0.656 ±0.032 ^{C''}	Σ 6637	Σ 6464

As letras A, B, C, D e E correspondem à escala padronizada de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 5 – Incidência de MNPCEs e razão PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após tratamentos por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Red 40^{E-129}.

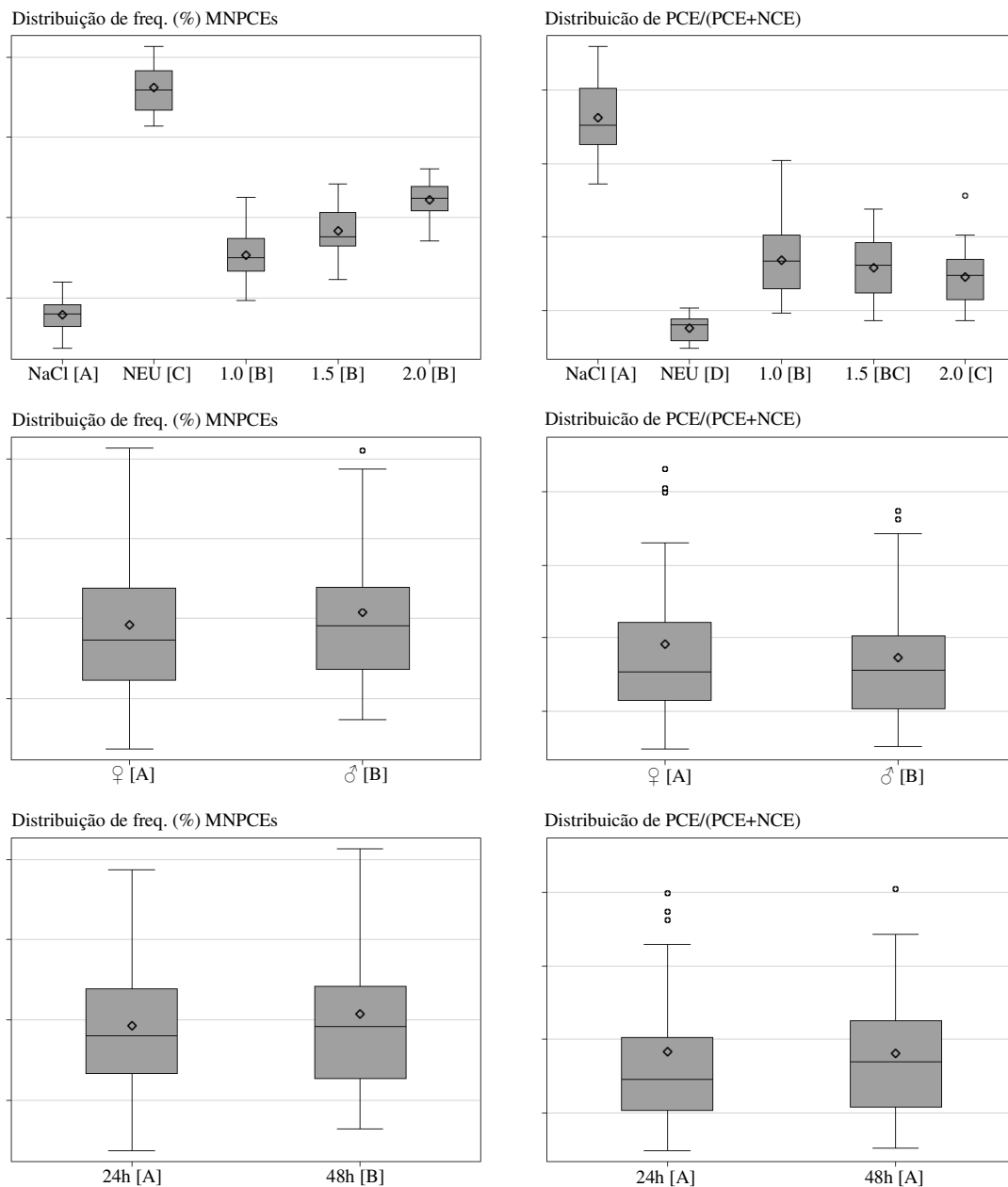


Figura 6 - A incidência de MNPCEs e PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após testar por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Ponceau 4R^{E-124}.

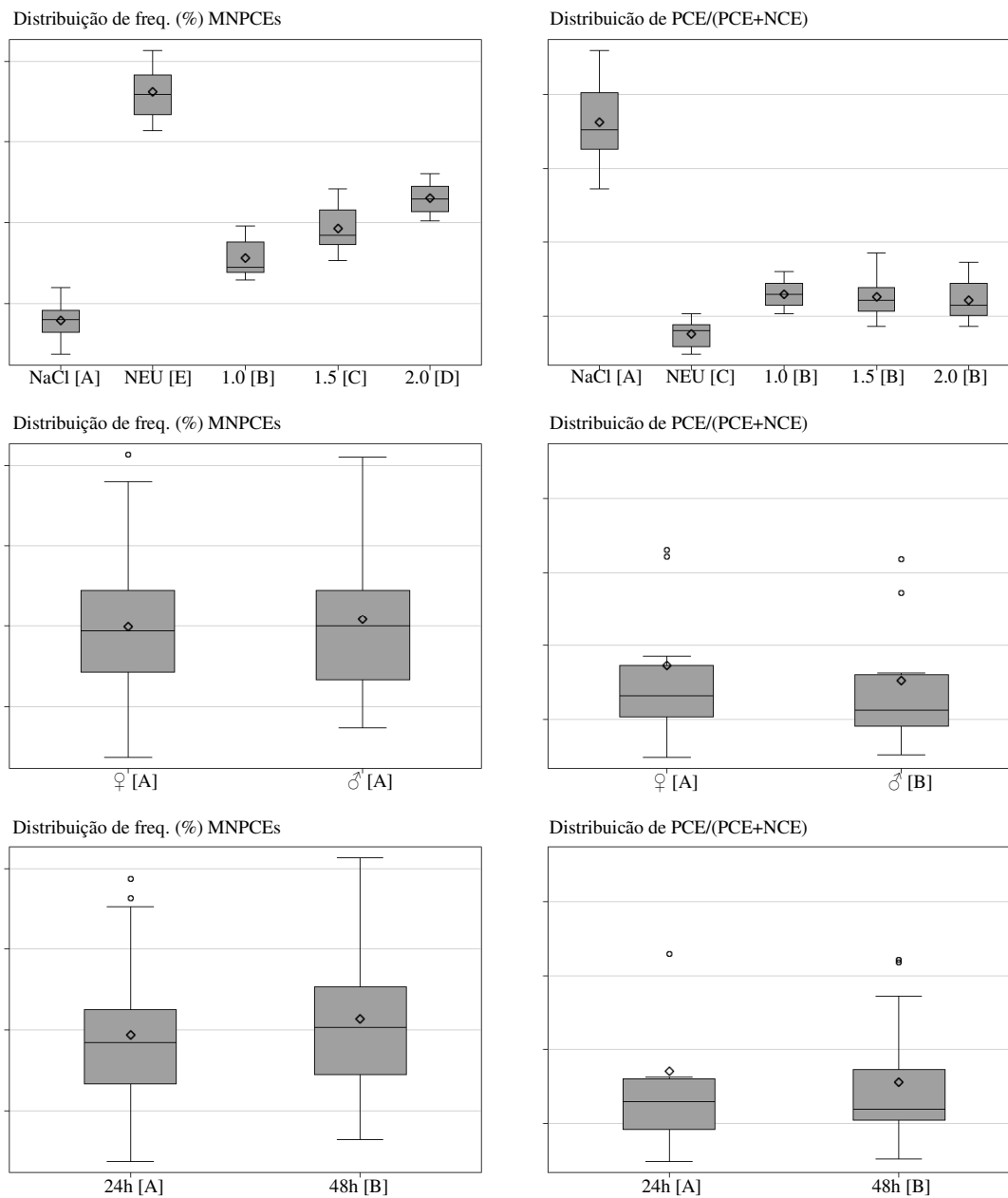


Figura 7 - A incidência de MNPCEs e PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após testar por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Tartrazina^{E-102}.

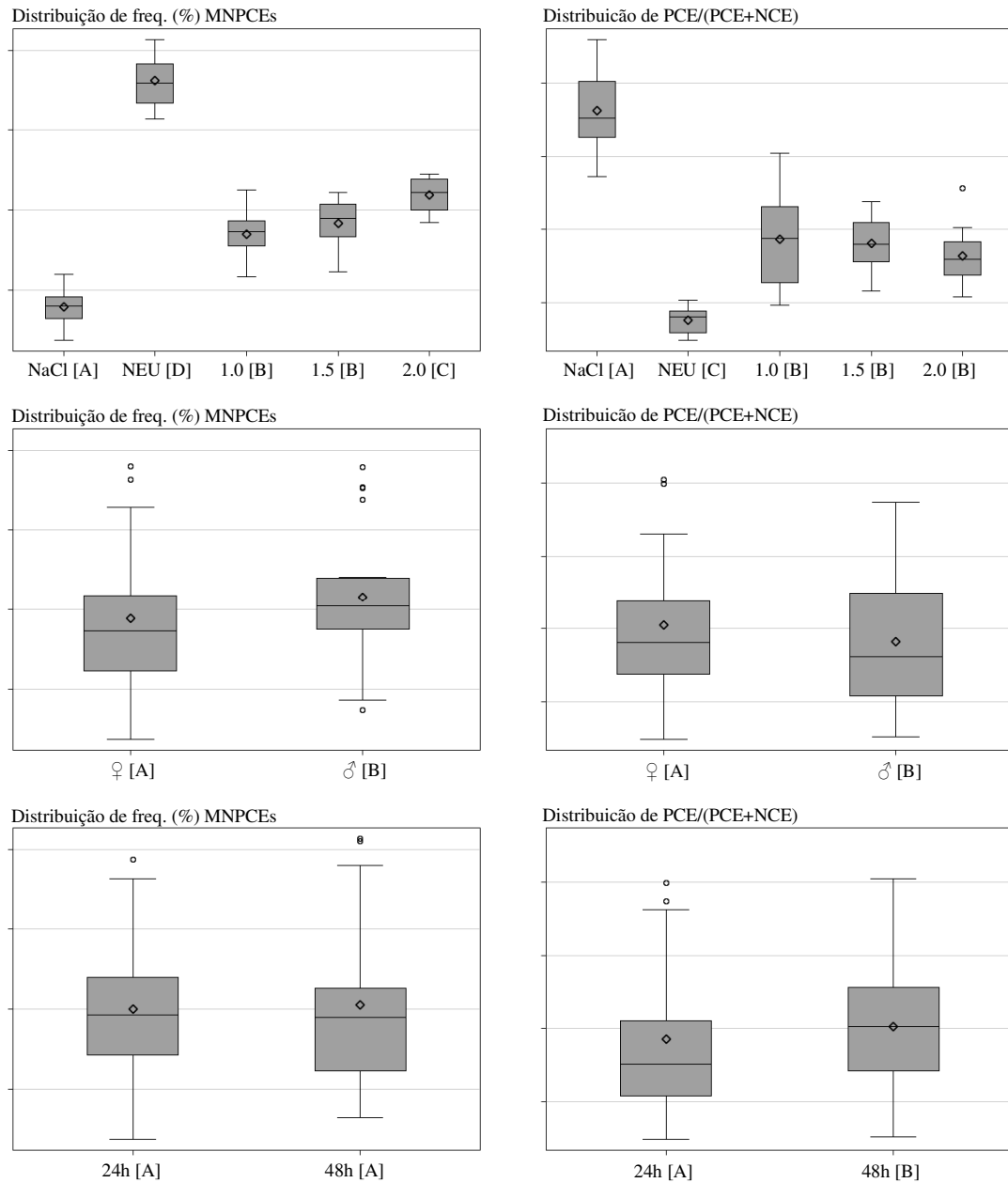
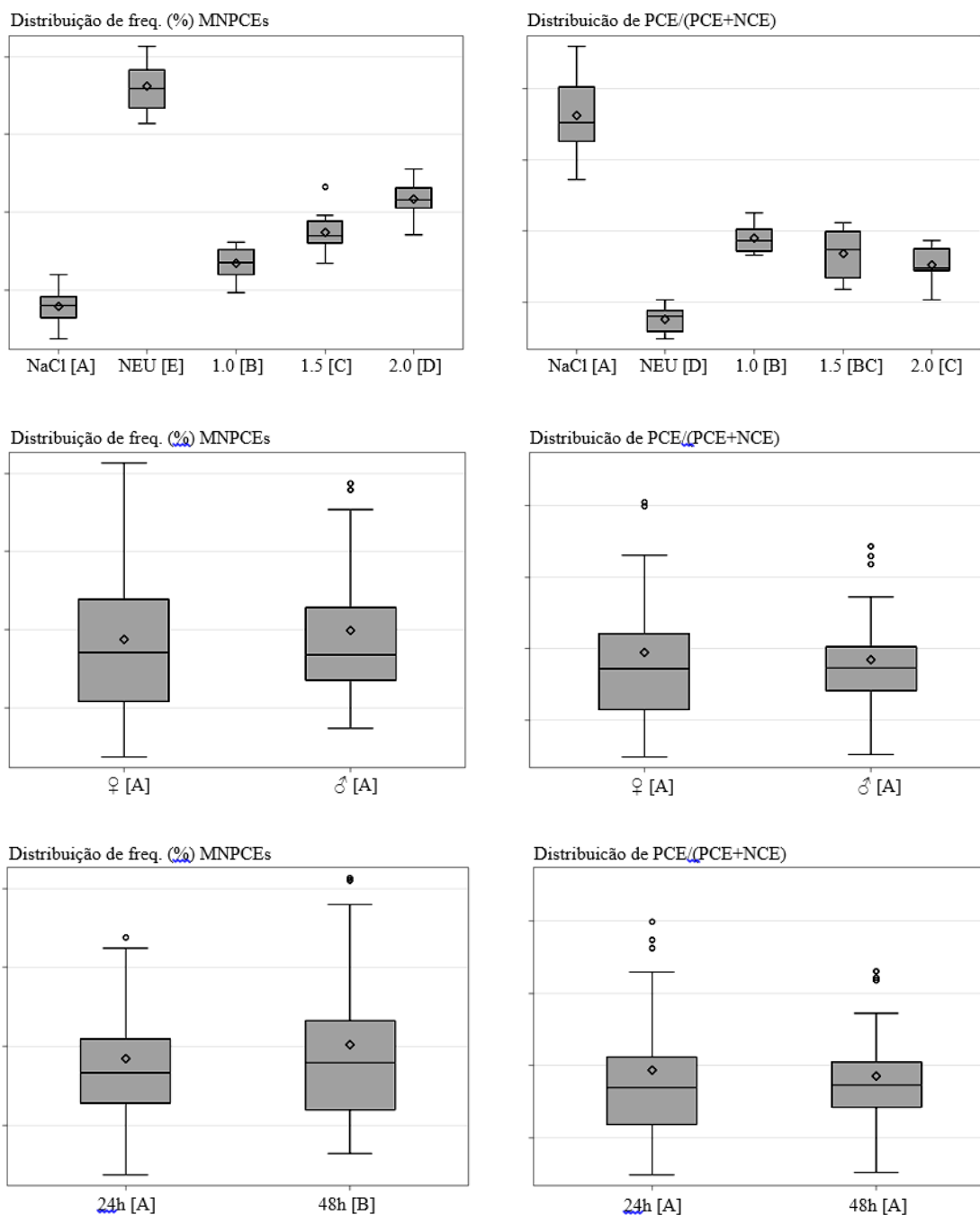


Figura 8 - A incidência de MNPCEs e PCE/NCE na medula óssea de camundongos *Swiss albinus*, machos e fêmeas, após testar por 24h e 48h. São apresentados os dados dos grupos controle (NaCl e NEU) e avaliação da genotoxicidade do corante Amarelo crepúsculo^{E-110}.



O Quadro 2 apresenta um resumo dos resultados da pesquisa quanto ao potencial genotóxico e citotóxico dos quatro corantes em questão, dependente da dose, do tempo de exposição e do sexo.

Quadro 2 – Resumo dos resultados de genotoxicidade e citotoxicidade de corantes azóicos segundo fatores dependentes.

Corante	MN	MN	MN	PCE/NCE	PCE/NCE	PCE/NCE
	D – Dep	T - Dep	S - Dep	D – Dep	T – Dep	S – Dep
Vermelho 40	-	+	+	+	-	+
Ponceau 4R	+	+	-	-	+	+
Tartrazina	+	-	+	-	+	+
Amarelo Crepúsculo	+	+	-	+	-	-

MN – Ensaio de Micronúcleo.

PCE/NCE – Razão entre Eritrócitos Policromáticos e Eritrócitos Normocromáticos

D – dose; T – tempo; S – sexo / Dep – dependente.

- (negativo); + (positivo).

5 DISCUSSÃO

Tem-se discutido a respeito da toxicidade dos corantes sintéticos e dos riscos que podem causar à saúde. Geralmente, estão associados ao modo e ao tempo de exposição aos mesmos. Muitos dos problemas de saúde, como alergias, rinite, bronco constrição, hiperatividade, danificação cromossômica, tumores, entre outros, têm sido reportados autores diversos (MARMITT et al., 2010).

Genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA, processo este classificado como mutagênese; quer seja na alteração determinismo genético celular ou orgânico, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (ERDTMANN, 2003; BORTOLOTTI, 2007).

Em ensaio de micronúcleo em ratos, foi determinada a genotoxicidade dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho 40 e ponceau 4R. Este teste é considerado adequado para a detecção de efeitos clastogênicos de compostos administrados por via oral por sonda (VANHAUWAERT et al., 2001). A maior parte dos corantes ingeridos atingem o cólon e são rapidamente metabolizados pela microbiota intestinal (OULD ELHKIM et al., 2007; EFSA, 2008). Conseqüentemente, após a administração oral, o cólon é o principal órgão alvo destes corantes e seus metabólitos. O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo* e *in vitro* (HAYASHI, 1983).

Segundo Moutinho et al. (2007) foi observado um aumento significativo na produção de linfócitos e eosinófilos na mucosa do antro gástrico dos ratos. Não foram observadas alterações carcinogênicas em nenhuma das regiões gástricas com a dose e tempo utilizados (7,5 mg de tartrazina/kg/dia durante dez meses). Os autores sugerem estudos modificando-se a dose e o tempo de exposição ao referido corante, de forma a permitir a observação dos efeitos associados a outros carcinógenos. Doses de 1 a 5 mg de tartrazina foram suficientes para provocar urticária e de 1 a 10mg, casos de bronco-espasmo (SCHVARTSMAN, 1982). Segundo Sasaki et al. (2002), a tartrazina induz ao dano no DNA em estômago, cólon e bexiga urinária com dose de 10 mg/kg. Esta dose é próxima à aceitável para o consumo de acordo com a IDA. Segundo Ould Elhkim et al. (2007), a tartrazina não apresentou potencial cancerígeno em ratos e camundongos.

Danos ao DNA causados pela tartrazina a 2000mg/kg, foram avaliados 24 horas após a administração, enquanto que outros corantes alimentares, por exemplo, amarelo crepúsculo,

não produziram um aumento, estatisticamente significativo, de danos ao DNA em células do cólon (POUL et al., 2009). O uso prolongado deste corante provocou aumento do número de linfócitos da mucosa gástrica e eosinófilos em ratos *Wistar* (MEHEDI et al., 2009).

Tartrazina induziu aberrações cromossômicas nas células de fibroblastos de *Muntjac Muntiacus*, células da medula óssea de ratos e camundongos, e cromossomos de *Allium cepa* (MPOUNTOUKAS et al., 2010).

De acordo com os estudos de toxicidade relatados por Sobotka e colaboradores, tartrazina exerceu efeitos neurocomportamentais mínimos e desenvolveu efeito neuromotor somente em ratos fêmeas (1,0% a 2,0% na dieta).

No que diz respeito a estudos toxicológicos de tartrazina em mamíferos, Davis et al. (1964) relataram que a incidência de tumores e as doenças incidentes comuns não foram afetadas pela tartrazina na dieta (0,5% a 5,0%) num estudo de toxicidade crônica em ratos. Maekawa et al. (1987) encontraram que a tartrazina em água de beber (1,0% a 2,0%) não mostraram efeitos carcinogênicos em um estudo de toxicidade em ratos. Borzelleca & Hallagan (1988) também relataram que os níveis sem efeitos adversos observados de tartrazina eram de 5,0% (2641 e 3348 mg/kg/dia para homens e mulheres, respectivamente) em ratos e ratos filhotes (8103 e 9735 mg/kg/dia para machos e fêmeas, respectivamente). No entanto, Amin et al. (2010) concluíram que tartrazina afetou e alterou marcadores bioquímicos em órgãos vitais, por exemplo, fígado e rim. Tartrazina também inflamou o estômago (aumento do número de linfócitos e eosinófilos) de ratazanas quando administrado na ração alimentar por um período de tempo prolongado (MOUTINHO et al., 2007).

Sasaki et al. (2002) mostraram que dois corantes de alimentos, sendo um deles a tartrazina, a partir de 10mg/kg, induziu danos ao DNA relacionados com a dose (teste do cometa) no cólon de rato 3h após a administração oral. Danos do DNA foram também evidentes para tartrazina a 2000 mg/kg, 24h após a administração. Outro corante alimentar, amarelo crepúsculo, não apresentou uma diferença, estatisticamente significativa, quanto ao aumento dos danos ao DNA das células do cólon. Realizada necropsia e exame histopatológico dos órgãos, revelaram-se nenhum efeito no cólon, o que indica que é improvável que os danos ao DNA seja devido a citotoxicidade.

Tsuda et al. (2001) realizaram estudos com diversos corantes, utilizados em vários países, dentre eles o vermelho de ponceau (Ponceau 4R). Ficou demonstrado que este corante é capaz de induzir danos ao DNA em cólon de camundongos a partir de 10 mg/Kg medidos pelo Teste do Cometa.

Segundo estudos realizados por Mpountoukas et al. (2010), alguns corantes alimentares, dentre eles a tartrazina, foram testados em células do sangue periférico de humanos (*in vitro*), com a finalidade de investigar o seu potencial genotóxico, citotóxico e citostático. Ficou demonstrado que, na maior concentração testada (2000 mg/Kg), a tartrazina apresentou apenas potencial citotóxico, o que também é explicado pela citotoxicidade local dos corantes (POUL et al., 2009).

Os corantes azóicos, tartrazina e vermelho 40, apresentaram respostas genotóxicas nas avaliações quanto a genotoxicidade nas concentrações 1,5, 2,5 e 3,0 mg/mL para tartrazina e 5, 10 e 20 mg/mL para o vermelho 40 em testes de células somáticas de asa de *Drosophila melanogaster* (LOCATELLI, 2008).

Em outra pesquisa, Shimada et al. (2010) com o propósito de analisar os danos ao DNA induzidos pelo azo corante vermelho de ponceau e outros, em camundongos e ratos por meio do Teste do Cometa, observaram que, em camundongos, todos os corantes estudados induziram alterações ao DNA de células do cólon em 3 horas após a administração de 10 mg/Kg de peso. Entretanto, os ratos não apresentaram efeitos genotóxicos em nenhuma dose administrada (até 100 mg/Kg de peso).

O corante amarelo crepúsculo, como mencionado por Sardi et al. (2010), pode induzir angioedema, vasculite e desencadear reações alérgicas graves em pessoas que tem sensibilidade a paracetamol, ácido acetilsalicílico, e benzoato de sódio.

Um estudo realizado por Sayed et al. (2012) demonstrou a ação mutagênica, deste corante, em ratos, ocasionando aberrações cromossômicas no fígado e nas células germinais, fragmentação do DNA e aumento de anormalidades morfológicas em espermatozoides desses animais.

Entretanto, investigações visando o conhecimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de corantes azóicos foram alvo de um número limitado de pesquisas, fato este que impulsionou avaliar os efeitos nocivos, sob a óptica mutagênica (i.e., clastogenicidade e/ou aneugenicidade) dos quatro corantes azóicos supracitados (vermelho 40, Ponceau 4R, tartrazina e amarelo crepúsculo) por meio do ensaio do MN *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Todos os corantes estudados, Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Vermelho 40 e Ponceau 4R, apresentaram toxicidade mutagênica e citológica. A adoção do Teste de Micronúcleo *in vivo* apresentou-se como um eficiente biomarcador, cujo resultou nestas importantes constatações.

Tal resultado reforça a hipótese de risco a saúde humana e animal devido ao consumo destes aditivos alimentares e a necessidade de que os mesmos sejam mantidos sob permanente observação e constantes avaliações, uma vez que há variações das condições de uso e também de quaisquer novos dados científicos.

REFERÊNCIAS

- ABIMA. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. **Informe Técnico**, n. 30, 2007.
- ALMASSY, Z. et al. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection: a review. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation**, New York, v. 38, n. 4, p. 241–249, 1987.
- ALMEIDA, M. R. et al. Spectroscopic and theoretical study of the “Azo”-Dye E124 in condensate phase: Evidence of a dominant hydrazo form. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 114, n. 1, p. 526–534, 2010.
- AL-SABTI, K. Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 47, p. 149–155, 2000.
- AMIN, K. A; ABDEL HAMEID, H; ELSTTAR, A. H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 2994–2999, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos. Consolidação das normas e padrões de alimentos**. São Paulo: CLA/CNPA/ABIA, 2001.
- BERDICK, M. Safety of food colors. In: HANTHCOCK, J. N. **Nutritional Toxicology**. New York: Academic Press, 1982. v. 1. p. 383–434.
- BESSONOV, V. V. et al. Development of methods for determining acrylamide in food products by gas-liquid chromatography. **Vopr Pitan**, Moscou, v. 80, n. 4, p. 79–83, 2011.
- BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 625–631, 2007.
- BORIOLLO, M. F. G. et al. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart.bark in the micronucleus assay. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 2, p. 428–438, 2014a.
- BORIOLLO, M. F. G. et al. Nongenotoxic effects and a reduction of the DXR-induced genotoxic effects of *Helianthus annuus* Linné (sunflower) seeds revealed by micronucleus assays in mouse bone marrow. **BMC Complementary and Alternative Medicin**, London, v. 14, n. 121, p. 1–15, 2014b.

BORIOLO, M. F. G. et al. **Comparação da mutagenicidade entre eritrócitos policromáticos (medula óssea) e normocromáticos (sangue periférico) micronucleados obtidos no testes do micronúcleo em roedores *in vivo***. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA, 3., SEMIC – SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIFENAS, 7., 2008, Alfenas. **Anais...** Alfenas : UNIFENAS, 2008.

BORTOLOTO, T. **Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário municipal de sombrio, Santa Catarina, utilizando *Artemia sp.* e *Allium cepa L.*** 2007. 79 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

BORZELLECA, J. F; HALLAGAN, J. B. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of FD&C Yellow No. 5 (tartrazine) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 26, p. 179–87, 1988a.

BRASIL. ANVISA. Portaria SVS/MS 540, de 27 de outubro de 1997. **Aprova o Regulamento Técnico:** aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. 1997.

BRASIL. ANVISA. **Resolução-CNNPA nº 44**, 1977.

BRASIL. Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965. Dispõe sobre as Normas Reguladoras do Emprego de Aditivos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília: Poder Executivo, 1965.

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

BRASIL. MAPA. Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. Institui consulta pública da instrução normativa que aprova o regulamento técnico sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização de aditivos para alimentação animal. **Poder Executivo**, 2003.

BRASIL. MAPA/SDA. Registro de estabelecimento e produtos, rotulagem e propaganda e para isenção de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia e aprova os padrões de qualidade e identidade para alimentos destinados à cães e gatos. **Diário Oficial da União**, 2009^a.

BREITHAUPT, D. E. Modern application of xanthophylls in animal feeding e a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, n.10, p. 501–506, 2007.

CARVALHO, J. C. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Curitiba: Universidade Federal do Paraná/Departamento de Engenharia Química, 2004.

CARVALHO, M. B. et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n. 8, p. 317–322, 2002.

CHEESEMAN, M. A. Artificial food color additives and child behavior. **Environmental Health Perspectives**, v. 20, n. 1, p. 15–16, 2012.

CHOW, C. S; BARTON, J. K. Transition metal complexes as probes of nucleic acids. **Methods in Enzymology**, New York, v. 212, p. 219–242, 1992.

CHOY, W. N. Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis. In: CHOY, W. N. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 47–72.

CHRISTIE, R. M. **Colour Chemistry**. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 2001.

CHUNG, K. T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 114, p. 269–281, 1983.

CHUNG, K. T; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 277, n. 3, p. 201–220, 1992.

CLYDESDALE, F. M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 1, p. 83–101, 1993.

COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST–CSGMT. Sex differences in the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 151–163, 1986.

COMBES, R. D; HAVELAND-SMITH, R. B. A review of the genotoxicity of food drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 101–248, 1982.

CROCE, J. Muita cor e algum risco nas balas. **Consumidor S.A**, São Paulo, v. 2, p. 5–8, 1965.

DAVIS, K. J; FITZHUGH, O. G; NELSON, A. A. Chronic rat and dog toxicity studies on tartrazine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 6, p. 621–626, 1964.

DEL GIOVINE, L; BOCCA, A. P. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. **Food Control**, Vurrey, v. 14, n. 3, p. 131–135, 2003.

DOWNHAM, A; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 5–22, 2000.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003. Appendixes 3 & 4. Annex: List of additives. **Animal Health and Welfare**, 2010.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Decisão da Comissão de 21 de dezembro de 1998, relativa as disposições nacionais notificada pelo Reino da Suécia respeitantes à utilização de determinados corantes e edulcorantes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, p. 13–22, 1999.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Directiva n. 94/36/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de junho de 1994, relativa aos corantes para utilização nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, p. 13–29, 1994.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) n. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003, on additives for use in animal nutrition. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, p. 29–43, 2003.

ASSESSMENT OF THE RESULTS OF THE STUDY BY MCCANN. On the effects of some colours and sodium benzoate on children's behaviour. **EFSA Journal**, v. 660, p. 1–53, 2008.

ENAYATZAMIR, E. et al. Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 169, n. 1–3, p. 176–181, 2009.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de cada dia. In: SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 23–46.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives. **Food and Agriculture Organization**, Geneva, p.1–37, 1974.

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**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 11–20, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. **Code of Federal Regulations**, 2007.

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

GIRI, A. K. et al. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations in mice after *in vivo* exposure of green S - a food colorant. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 19, n. 3, p. 223–226, 1992.

HATHCOCK, J. N; RADER, J. I. Aditivos, contaminantes e toxinas naturais de alimentos. In: SHILS, M; OLSON, J; SHIKE, M. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. São Paulo: Manole, 2003.

HAYASHI, M. et al. *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, n. 3, p. 293–304, 1994.

HAYASHI, M; SOFUNI, T; ISHIDATE, M. Jr. An application of acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 120, n. 4, p. 241–247, 1983.

HEDDLE, J. A; RAJ, A. S; KREPINSKY, A. B. The micronucleus assay. Part II. *In vitro*. In: STICH, H. F; SAN, K. H. C. **Short-term Tests for Chemical Carcinogens**. New York: Springer, 1981, p. 250–254.

HEDDLE, J.A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61–118, 1983.

IFT FOOD COLOURS. A Scientific status summary by the Institute of Food Technologists' expert panel of food safety and nutrition and the Comite of Public Information. **IFT Food Colours**, v. 1, n. 3, 1986.

IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 79–82, 2006.

INOUE, M. et al. Public awareness of risk factors for cancer among the Japanese general population: a population based survey. **BMC Public Health**, London, v. 6, n. 2, p. 241–245, 2006.

JAGER, I; HAFNER, C; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of diferente textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 561, p. 35–44, 2004.

JECFA. World Health Organization. Sunset Yellow FCF. **WHO Food Additives Series**, v. 17, 1982.

KASHANIAN, S; DOLATABADI, J. E. N. DNA binding studies of 2-tert-butyl hydroquinone (TBHQ) food additive. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 116, n. 3, p. 743–747, 2009.

KELLY, T. M. et al. A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 17, p. 6017–6034, 1985.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non disjunction. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 392, n. 1–2, p. 19–30, 1997.

KRISHNA, G; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 155–166, 2000.

KULLA, H. G. et al. Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes orange I and orange II. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 135, p. 1–7, 1983.

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

LIMA, A. L. S; PEREIRA, M. H. G; PINTO, L. H. P. A. C. **Corantes sintéticos: a química das cores**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2007.

LOCATELLI, K. M. M. **Detecção da genotoxicidade dos corantes artificiais amarelo tartrazina e vermelho 40, pelo testes SMART de asa, em *Drosophila melanogaster***. 2008 [Dissertação] - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

LUNING, P; VAN DER SPIEGEL, M; MARCELIS, W. J. Colorants and Food Quality Management. In: **Food Colorants. Chemical and Functional Properties**. SOCACIU, C. CRC Press, 2008.

MAEKAWA, A. et al. Lack of carcinogenicity of tartrazine (FD&C Yellow No. 5) in the F344 rat. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 891–896, 1987.

MANSOUR, H. B. et al. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: acids yellow 17, violet 7 and Orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, p. 1670–1677, 2007.

MARMITT, S; PIROTTA, L; STULP, S. Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 384–388, 2010.

MATTER, B; SCHMID, W. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 417–425, 1975.

MEHEDI, N. et al. Reproductive toxicology of tartrazine (FD and C Yellow No. 5) in *Swiss Albinus* Mice. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, Nova York, v. 4, n. 4, p. 128–133, 2009.

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.

MOUTINHO, I. L. S; BERTGES, L. C; ASSIS, R. V. C. Prolonged use of food dye tartrazine (FD&C yellow n°5) and its effects on the gastric mucosa of *Wistar* rats. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 1–41, 2007.

MPOUNTOUKAS, P. et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 2934–2944, 2010.

MULTON, J. L. Spoilage mechanisms of grains and seeds in the post-harvest ecosystem, the resulting losses and strategies for the defense of stocks. In: MULTON, J. L. **Preservation and storage of grains, seeds and their by-products**. New York: Lavoisier, 1988, p. 3–59.

MURMANN, J. P. **Knowledge and Competitive Advantage: The Coevolution of Firms, Technology, and National Institutions (Cambridge Studies in the Emergence of Global Enterprise)**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

NACHIYAR, C. V; RAJAKUMAR, G. S. Mechanism of Navitan Fast Blue S5R degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 165–169, 2004.

NOVOTNÝ, C. et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, Oxford, v. 63, n. 9, p. 1436–1442, 2006.

OECD. **GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**. DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, 2007.

OECD C. **GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS**. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 1997.

ORSOLIN, P. C; NEPOMUCENO, J. C. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa* L.) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão da UNIPAM**, Patos de Minas, v. 6, p. 55–69, 2009.

OULD ELHKIM, M. et al. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine. An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 47, n. 3, p. 308–316, 2007.

PAN, X. R. et al. Characterizing the interaction between tartrazine and two serum albumins by a hybrid spectroscopic approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 12, p. 6650–6656, 2011.

PUBLIC CITIZEN HEALTH RESEARCH GROUP. **Dyes in your food**. The American Academy of Pediatrics Committed on Drugs in Pediatrics, 1985.

PINTEA, A. M. Quality and safety of food colorants. In: **Food Colorants: chemical and functional properties**. Hardback/USA: SOCACIU/CRC Press, 2007.

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

POLYANICHKO, A. M. et al. The effect of manganese (II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, n. 3, p. 989–996, 2004.

POUL, M. et al. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 443–448, 2009.

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

RABELLO-GAY, M. N; RODRIGUES, M. A. L. R; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 83–85, 1991.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Brasília: Ulbra, 2006, p. 173-199.

RIGONI, R. E. **Degradação de corante alimentício amarelo crepúsculo utilizando fotocatalise**. 2006. 77 f. [Dissertação mestrado]. Universidade Regional Integrada do Ato Uruguai e das Missões – Rio Grande do Sul, 2006.

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.

SALVADORI, D. M. F; RIBEIRO, L. R; FENECH, M. **Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro***. **Mutagênese Ambiental**. Brasília: ULBRA, 2003.

SARDI, M. et al. Use of retailer fidelity card schemes in the assessment of food additive intake: sunset yellow a case study. **Food Addit Contam**, London, v. 27, n. 11, p. 1507–15, 2010.

SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 519, n.1–2, p. 103–119, 2002.

SAYED, H. M. et al. The modifying effect of selenium and vitamins A, C and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 744, n. 2, p. 145–53, 2012.

SBMCTA, SÉRIE DOCUMENTOS. Orientações básicas de execução de testes de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. **Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**, 2005.

SCHMID, W. Chemical mutagens. In: HOLLENDER, A. **The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis**. New York: Plenum Press, 1976, p. 31–53.

SCHVARTSMAN, S. Aditivos alimentares. **Pediatria**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 202–210, 1982.

SHAHRIM, Z. et al. The *in vivo* rodent micronucleus assay of kacip fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 23, p. 214–219, 2006.

SHIMADA, C. et al. 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, N. O; REED, E. Estudo sobre corantes artificiais em alimentos: quais os riscos mais comuns pelo consumo excessivo. **Cadernos de Educação, Tecnologia e Sociedade (CETS)**, Inhumas, v. 2, n. 1, p. 83–86, 2010.

SWEENEY, A. E; CHIPMAN, J. K; FORSYTHE, S. J. Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 6, p. 119–122, 1994.

TEIXEIRA, C. G. Aditivos em alimentos. **Boletim do CEPPA**, n. 18, p. 1–22, 1969.

TITENKO - HOLLAND, N. et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion - exposed workers. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 338, p. 85–95, 1997.

TRICARD, C; CAZABEIL, J. M; MEDINA, B. Identification of natural dyes added to food products. **Sciences Des Aliments**, França, v. 18, p. 25–40, 1998.

TSUDA, S. et al. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 61, n. 1, p. 92–99, 2001.

VANHAUWAERT, A; VANPARYS, P; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vivo* gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis**, New York, v. 16, n. 1, p. 39–50, 2001.

VENKATESH, P. et al. Modulation of doxorubicin–Induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: A micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 42–53, 2007.

WANG, L. K; HUNG, Y. T; SHAMMAS, N. K. Physicochemical treatment process. In: **Handbook of Environmental Engineering**. New Jersey: Humana Press Inc, 2005.

WEVER, J; MÜNZNER, R; RENNER, H. W. Testing of sunset yellow and orange II for genotoxicity in different laboratory animal species. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 13, n. 3, p. 271–276, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. Codex general standard for food additives. Codex STAN 192-1995**. Geneva: World Health Organization, 1995.

YAMAMOTO, K. I; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and poisons. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 127–131, 1980.

ZAMBRANO, M. A; TARGA, H. J; RABELLO–GAY, M. N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, Baltimore, v. 57, n. 1, p. 48–49, 1982.