



Citotoxicidade e genotoxicidade dos corantes alimentares Azul Patente e Verde Rápido associados entre si: aditivos presentes na formulação do aditivo de cor *Blue Jeans*.

Cytotoxicity and genotoxicity of the associated patent Blue and Fast green food colors: additives present in the formulation of the Blue jeans color additive.

Amanda de Almeida dos Santos (Orientado)*, Ana Paula Peron (Orientador) †

RESUMO

Os corantes alimentares Azul Patente e Verde Rápido são os aditivos de cor presentes na formulação corante *Blue Jeans*, mix de corantes comercializado por diferentes empresas. Esse mix de aditivos é utilizado na coloração de bolos e doces para festas. Há estudos na literatura científica avaliando a toxicidade dos dois corantes trifenílmantanos mencionados individualmente, no entanto, não há informações sobre a toxicidade desses microingredientes associados entre si. Objetivou-se avaliar o mix de corante *Blue Jeans*, nas formas líquida e em pó, nas concentrações de 2,0 e 1,0 mL/L, e 5,0 e 2,5g/L, respectivamente. As concentrações foram estabelecidas conforme recomendação informada nos rótulos do produto. A marca comercial avaliada foi escolhida devido ser a principal indústria de fabricação aditivos alimentares das regiões sul e sudeste do Brasil. Para cada concentração utilizou três bulbos de cebola, que foram previamente enraizados em água destilada. Antes de colocar as cebolas enraizadas em contato com as suas respectivas soluções, coletou-se raízes para o controle do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em contato com as suas específicas concentrações por 24 e 48 horas, onde se coletou raízes a cada 24 horas. Após a fixação das raízes em solução Carnoy, as regiões meristemáticas foram destacadas, esmagadas e coradas com orceína acética, e lâminas foram confeccionadas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em objetividade 40X, e para cada concentração avaliou-se 9.000 células. Os dados obtidos foram analisados pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). As concentrações avaliadas do mix de corante em questão, na forma líquida e em pó, causaram citotoxicidade aos meristemas de raízes, inibindo de forma significativa o índice de divisão celular nos dois tempos de exposição considerados. Porém, não induziram a formação de alterações celulares em número significativo, mostrando-se não genotóxicas. Os resultados obtidos, ainda que preliminarmente, demonstram que os corantes Azul Patente e Verde Rápido em associação e em porcentagens reais de utilização pela população, têm potencial em causar toxicidade em nível celular.

Palavras-chave: *mix* de corantes, divisão celular, alterações celulares.

ABSTRACT

Blue Patent and Fast Green food colorings are the color additives present in the *Blue Jeans* coloring formulation, a mix of colorants marketed by different companies. This mix of additives is used in the coloring of cakes and sweets for parties. There are studies in the scientific literature evaluating the toxicity of the two triphenylmethane dyes mentioned individually, however, there is no information on the toxicity of these microingredients associated with each other. The objective was to evaluate the BLUE Jeans dye mix, in liquid and powder forms, at concentrations of 2mL/L and 0.005g/L, respectively. The evaluated brand was chosen because it is the main food additive manufacturing industry in the south and southeast regions of Brazil. For each concentration, three onion bulbs were used, which were previously rooted in distilled water. Before placing the rooted onions in contact with their respective solutions, roots were collected to control the bulb itself. Then, the remaining roots were placed in contact with their specific concentrations for 24 and 48 hours, where roots were collected every 24 hours. After fixing the roots in Carnoy solution, the meristematic regions were detached, crushed and stained with acetic orcein, and slides



were made. The slides were analyzed under an optical microscope in a 40X objective, and for each concentration 9,000 cells were evaluated. The data obtained were analyzed using the Scott-Knott test ($p < 0.05$). The evaluated concentrations of the dye mix in question, in liquid and powder form, caused cytotoxicity to root meristems, significantly inhibiting the cell division index in the two exposure times considered. However, they did not induce the formation of cellular alterations in a significant number, proving to be non-genotoxic. The results obtained, albeit preliminary, demonstrate that the Patent Blue and Rapid Green dyes in association and in real percentages of use by the population, have the potential to cause toxicity at the cellular level.

Keywords: dye mix, cell division, cell changes.

1 INTRODUÇÃO

Os aditivos ou micro ingredientes alimentares tornaram-se obrigatórios na alimentação moderna sobretudo por sua capacidade em manter por longa data a qualidade de alimentos comercializados em supermercados (XU et al., 2013). Em meio a essas substâncias estão os corantes. Estes aditivos possuem grande diversidade de estruturas e aplicações, sendo imprescindíveis para diversos setores industriais.

Em âmbito mundial, o controle do uso de corantes alimentares se dá com base na Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é estabelecida em resultados de pesquisas de avaliação de toxicidade pelo Comitê de Aditivos Alimentares e Contaminantes (CODEX). No Brasil, a permissão de uso e a determinação de níveis máximos de aditivos alimentares toleráveis são de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Saúde, que realizam essas atividades por meio do Comitê Permanente de Aditivos Alimentares (FÁVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011).

No Brasil é permitido o uso de onze corantes artificiais, os quais são classificados pelo International Numbering System (INS), que são: Tartrazina (INS-102), Amarelo Crepúsculo (INS-110), Amaranto (INS-123), Ponceau 4R (INS -124), Eritrosina (INS-129), Vermelho 40 (141), Azul Patente V (131), Indigotina (INS-132), Azul Brilhante (INS - 133), Verde Rápido (INS - 143) e Azurubina (INS - 122) (BARROS, 2014). Estes corantes obtidos por síntese orgânica e classificados em quatro grupos, que são: azo, trifenilmetano, indigóide e xantenos (BATADA; JACOBSON, 2016).

No intuito de potencializar a ação desses corantes, existem muitas formulações comerciais que têm em sua constituição um *mix* de corantes, o que garante uma coloração mais duradoura e destacada aos alimentos industrializados e semi-industrializados. Dentre essas, destaca-se a formulação comercial *Blue Jeans* constituída pelos corantes trifenilmentanos Azul Patente e Verde Rápido. Muitas indústrias de aditivos produzem esse tipo de *mix* comercial no Brasil, que pode ser obtido pela população diretamente das empresas fabricantes ou em comércios de produtos diversos. Após uma busca na literatura científica, não foram encontrados estudos de toxicidade sobre o *Blue Jeans*.

Plantas superiores são considerados eficientes para a avaliação da toxicidade de substâncias e de compostos químicos (CZERNIAWSKA-KUSZA; KUSZA, 2011; GOMES et al., PERON et al., 2013). Dentre os testes internacionalmente aceitos na avaliação da qualidade ambiental está o bioensaio *A. cepa* (cebola). Os meristemas de suas raízes são utilizados rotineiramente para determinar os efeitos tóxicos de compostos presentes em corpos hídricos e terrestre, inclusive em baixas concentrações (HERRERO et al., 2012). Os



biomarcadores empregados nesse ensaio são o índice mitótico (índice de divisão celular), para avaliação dos diferentes níveis de citotoxicidade, e a frequência de alterações cromossômicas e de fuso mitótico, para a avaliação de genotoxicidade (MATOS et al., 2017). Os resultados obtidos por meio do bioensaio *A. cepa* apresentam boa correlação aos resultados observados em testes genéticos realizados em outros bioensaios, como aqueles com animais (SOUZA et al., 2017). Esse bioensaio também é eficiente na avaliação de diferentes aditivos alimentares, entre os quais estão os corantes (GOMES et al., 2013; PERON et al., 2013). Com base no que foi descrito, pergunta-se: Os corantes Azul Patente e Verde rápidos associados entre si, com base em suas concentrações no mix de corantes *Blue jeans*, causarão toxicidade as células meristemáticas de raízes de *A. cepa*?

2 MÉTODO

As concentrações analisadas foram determinadas com base na orientação do frasco do corante *Blue Jeans*. No rótulo sugeria-se que para o corante em pó a primeira concentração seria 5g do corante para 1 litro de água. Já para o corante em líquido a concentração sugerida foi de 2 ml do corante para 1 litro de água.

Assim, foram analisadas a concentração de uso sugerida para população, e uma concentração 50% menor. Portanto, para o *mix* corante em pó as concentrações analisada foram: 5g e 2,5g /L; e para o *mix* corante líquido as concentrações analisadas foram 2,0 e 1,0 mL/L. As concentrações foram preparadas em águas destilada. As concentrações dos corantes Azul Patente e Verde Rápido, conforme informações da embalagem do *mix* de corantes em pó e líquido, eram iguais.

Bulbos de cebola (variedade cristal beta, de horta orgânica) foram colocados em recipientes com água destilada, constantemente aerados, e germinados até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento. Para analisar cada concentração, foi estabelecido um grupo experimental com três bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com as respectivas concentrações, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servir de controle do próprio bulbo, o que foi identificado como tempo de análise 0 hora ou controle do próprio bulbo.

Em seguida, as raízes restantes de cada bulbo foram colocadas em suas específicas concentrações por 24 e 48 horas, procedimentos denominados tempos de exposição 24 e 48 horas, onde as raízes foram coletadas a cada 24 horas. Utilizou-se água destilada como controle negativo.

Um controle positivo foi preparado com metanos sulfonato de metila (MMS), uma substância conhecida por ser citotóxica e genotóxica para o sistema de teste *A. cepa* na concentração 4×10^{-4} mol/L. As raízes coletadas foram fixadas em solução Carnoy 3: 1 (etanol: ácido acético) por até 24 horas.

As lâminas foram montadas de acordo com o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002) e analisadas em microscópio óptico com objetiva de 40X. Para cada bulbo, foram avaliadas 1000 células, totalizando 3.000 células para cada grupo controle (0 horas), cada grupo tempo de exposição 24 horas e cada grupo tempo de exposição 48 horas, totalizando 9.000 células analisadas para toda concentração. As células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase foram contadas, e o índice mitótico foi calculado para determinar o potencial citotóxico. O índice mitótico ou índice de divisão celular foi calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{Número total de células em divisão}}{\text{Número total de células analisadas}} * 100 \quad (1)$$

O potencial genotóxico foi avaliado usando a frequência de micronúcleos, metáfases de colchicina,



pontes de anáfase e telófase, ampliações de genes, células com aderências, botões nucleares e anáfases multipolares, entre outras alterações.

$$\frac{\text{Número de alterações celulares}}{\text{Número total de células analisadas}} * 100 (2)$$

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias observadas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), com auxílio do software livre BioEstat®.

3 RESULTADOS

Com base na Tabela 1, verificou-se, nas condições de análises estabelecidas para esse estudo, que o *mix* decorantes da formulação *Blue Jeans*, em todas as concentrações e tempos de exposição considerados reduziram o índice de divisão celular dos meristemas de raízes, mostrando-se citotóxicos.

Tabela 1 Índices mitóticos (%) e índices de alteração celular (%) observados em meristemas de raízes de *A. cepa* expostos ao *Blue jeans*, nas formas em pó e líquida, em diferentes concentrações, nos tempos de exposição 24 e 48 horas.

Controle positivo		MI (%) / DP		
MMS	(4×10^{-4} mol/L ⁻¹)	7,5 ± 0,34		
Mix Corantes		MI (%) / SD		
		TR	Co (0 h)	
			24 h	48 h
Pó	5,0g/L	29,7 ± 0,17 ^a	2,9 ± 0,31 ^{b,*}	5,4 ± 0,17 ^{b,*}
	2,5g/L	29,0 ± 0,58 ^a	7,3 ± 0,45 ^{b,*}	4,9 ± 0,70 ^{b,*}
Líquido	2,0mL/	15,6 ± 0,27 ^a	3,9 ± 0,78 ^{b,*}	3,5 ± 0,89 ^{b,*}
	1,0 mL/L	22,0 ± 0,71 ^a	5,8 ± 0,45 ^{b,*}	7,3 ± 0,95 ^{b,*}
Controle Positivo		IAC (%) / DP		
MMS	(4×10^{-4} mol/L ⁻¹)	8,9 ± 0,5		
Mix de Corantes		IAC (%) / S D		
		TR	Co (0 h)	
			24 h	48 h
Pó	5,0g/L	0,01 ± 0,29 ^a	0,08 ± 0,13 ^a	0,07 ± 0,80 ^a
	2,5g/L	0,01 ± 0,23 ^a	0,05 ± 0,71 ^a	0,09 ± 0,77 ^a
Líquido	2,0 mL/L	0,01 ± 0,46 ^a	0,01 ± 0,41 ^a	0,03 ± 0,80 ^a
	1,0 mL/L	0,01 ± 0,19 ^a	0,03 ± 0,64 ^a	0,03 ± 0,64 ^a



Fonte: A autoria própria (2021).

Co: controle; MI: Índice Mitótico; IAC: Índice de Alteração Celular; TR: tratamento; h: hora, DP: Desvio Padrão, MMS: Metil Metanosulfonato. Análise de variância (ANOVA), médias observadas comparadas pelo teste Scott-Knott a 0,05, utilizando o software livre BioEstat®. Letras diferentes indicam valores médios diferentes entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24h e 48h) dentro de uma mesma concentração. *Valor obtido é igual ao valor observado para o controle positivo.

No entanto, as concentrações avaliadas, nas formas em pó e líquida do *mix* de corantes não causaram número de alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas significativo as células meristemáticas de raízes de *A. cepa* e, portanto, não foram genotóxicas.

De acordo com Herrero et al. (2012) sugere-se que a significativa inibição da divisão celular, como a observada nos meristemas de raízes de *A. cepa* expostos às concentrações de *Blue Jeans*, deve-se à morte celular causada por distúrbios - como pela ação tóxica de substâncias ou compostos - na cinética de divisão celular ou nos cromossomos essenciais a sobrevivência das células. Tais eventos, segundo Nunes et al. (2016), causam redução significativa no *turnover* celular e alteram a síntese protéica do tecido ou órgão onde ocorrem, prejudicando significativamente o crescimento e desenvolvimento do organismo.

Não foram encontrados estudos que demonstrassem a capacidade dos corantes Azul Patente e Verde Rápido, avaliados de forma individual, em causar alterações no ciclo de divisão celular. É importante mencionar que os corantes trifenilmetanos, de forma geral, ainda carecem de avaliações de toxicidade em nível celular.

Com base nesses resultados verifica-se a necessidade de se aprofundar as análises de avaliação de toxicidade desses dois corantes em outros bioensaios a fim de se obter parâmetros de comparação e, dessa forma, estabelecer com propriedade a real ação desses aditivos sobre a divisão celular.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, as duas concentrações do mix do corantes BLUE jeans causaram distúrbios na divisão células dos meristemas de raízes, inibindo a divisão células. Porém essas contrações não causaram alterações celulares em frequência significativa. Portanto, sugere-se que os corantes Azul Patente e Verde Rápido, nas condições de análises estabelecidas, têm potencial em causar alterações no ciclo celular em tecido de intensa proliferação celular.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- XU, Z., GU, C., WANG, K., JU, J., WANG, H., RUAN, K.; FENG, Y.. Arctigenic acid, the key substance responsible for the hypoglycemic activity of Fructus Arctii. *PHYTOMEDICINE*, v. 22, p. 128- 137, 2015
- BATADA, A.; JACOBSON, M.F. Prevalence of artificial food colors in grocery store products marketed to children. *CLINICAL PEDIATRICS*, v. 55, n. 12, p. 1113-1119, 2016.
- BARROS, W.R.P. Degradação eletroquímica dos corantes alimentícios amarantho e tartrazina utilizando H₂O₂ eletrogerado in situ em eletrodo de difusão gasosa (EDG) modificado com ftalocianina de cobalto (II) e cobre (II). Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. TESE DE DOUTORADO. Universidade de São Paulo. 2014.



RAWAT, D.; MISHRA, V.; SHARMA, R. S. Detoxification of azo dyes in the context of 15 environmental processes. CHEMOSPHERE, v. 155, p. 591-605, 2016.

CZERNIAWSKA-KUSZA, I.; KUSZA, G. The potential of the phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT, v.179, p.113-121, 2011.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. How to observe the chromosomes: a guide to techniques 425 in plant, animal and human cytogenetics. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 179 p.

NUNES, R.D.M.; SALES, I.M.S.; SILVA, S.I.; SOUSA, J.M.C., PERON, A.P. Antiproliferative and genotoxic effect of food additives with synthetic aroma and flavor, of the same types as natural and artificial. Brazilian Journal of Biology, v.77, p. 50-154, 2017.

GOMES, K.M.S.; OLIVEIRA, M.V.G.A.; CARVALHO, F.R.S.; MENEZES, C.C.; PERON, A. P. Cytotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazone yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ONLINE) v. 33, p. 218-223, 2013.

PERON, A. P.; AGUIAR, V.M.; Sousa, J.M.C.; Lima, L.H.M. Cytotoxicity of erythrosine (E-127), brilliant blue (E-133) and red 40(E-129) food dyes in a plant test system - doi: 10.4025/actascibiolsoci.v35i4.18419. ACTA SCIENTIARUM. BIOLOGICAL SCIENCES (ONLINE), v. 35, p. 557-562, 2013.