



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FLÁVIA CRISTINA BARBOSA LACERDA

**CITOTOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES SINTÉTICOS
UTILIZADOS NA DIETA HUMANA**

**Salvador BA
2017**

FLÁVIA CRISTINA BARBOSA LACERDA

**CITOTOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES SINTÉTICOS
UTILIZADOS NA DIETA HUMANA**

Orientador: Dr. Cleber Alberto Schmidt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador BA
2017**

Ao meu tripé familiar pelo apoio e força,
EU DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus e todas as entidades superiores / espíritos evoluídos de guarda que, de forma indireta, me mantiveram firme para concluir mais uma grande etapa da minha vida.

Aos meus amados e idolatrados pais, Fátima e Luiz, e irmã, Leila, a quem dedico essa honra, pelo imenso amor, zelo, dedicação e suporte emocional.

A minha grande amiga, Erica Shima, que por muitas vezes me mostrou o melhor caminho a seguir com o trabalho, me orientando e incentivando sempre.

A todos os colegas do *Laboratório de Controle Microbiológico, Produtos Farmacêuticos e Cosméticos*, em especial a Jamilly e Priscila, pela colaboração, apoio e pelos momentos de descontração, os quais tornaram meus dias mais leves e divertidos.

Ao professor Cleber Schmidt, pelo brilhantismo profissional, pela orientação e paciência.

À FAPESB pelo auxílio financeiro.

“Perceber o mundo em que se vive é o primeiro passo para modificá-lo”
André François

RESUMO

Os aditivos alimentares são utilizados para diversas finalidades, incluindo a conservação, coloração e o adoçamento de alimentos e bebidas. No mundo inteiro mais de 2500 aditivos alimentares naturais ou artificiais diferentes são acrescentados intencionalmente aos alimentos para produzir algum efeito desejado, porém, o uso de muitos deles foram proibidos em diversos países devido ao seu potencial toxicológico. A fim de estabelecer parâmetros de segurança para cada aditivo usado atualmente no mercado, o Comitê de Especialistas da *Food and Agriculture Organization* em Aditivos Alimentares (JECFA) utiliza os ensaios laboratoriais *in vitro* e *in vivo* como uma etapa para mensurar o potencial toxicológico dessas substâncias, porém, o parecer sobre a toxicidade de muitas delas ainda permanece incompleto. Nesse contexto e diante dos conhecimentos toxicológicos atualmente disponíveis na literatura, o estudo avaliou a citotoxicidade preliminar de alguns aditivos alimentares dos principais grupos de risco apontados pela literatura. Quatro adoçantes sintéticos (acesulfame de potássio, aspartame, sacarina sódica e sucralose), dois antioxidantes sintéticos (butilhidroxianisol e butilhidroxitolueno) e dois corantes sintéticos (azul brilhante FCF e tartrazina) foram avaliados quanto à atividade sobre a viabilidade e proliferação celular por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT) utilizando linhagens de células epiteliais de cólon humano (Caco2), de células hepáticas humanas (HepG2) e fibroblastos de tecido conjuntivo (NCTC L-929). Calculou-se o percentual de viabilidade celular e a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) na faixa de concentração entre 0,13 a 100 mM de cada amostra. Os fibroblastos L929 foram as células mais afetadas pelos aditivos avaliados neste estudo e a linhagem Caco2 foi a que teve sua viabilidade média menos alterada. Na maioria das amostras analisadas, os perfis das curvas de viabilidade de cada linhagem foram distintos para o mesmo aditivo e suas respectivas concentrações, o que impactou no valor de IC₅₀. Os bioensaios *in vitro* possuem um longo histórico no *screening* da toxicidade e outras respostas fisiológicas, pois são de fácil manuseio, tem baixo custo relativo, elevada sensibilidade, capacidade de gerar dados qualitativos e quantitativos de forma rápida e permitem a observação direta do efeito sobre as células, portanto são considerados como técnicas preliminares, que em conjunto com outros ensaios, possibilitam a predição da toxicidade ao organismo humano.

Palavras-chave: Bioensaio, Antioxidantes, Corantes, Edulcorantes, Toxicidade *in vitro*, Segurança alimentar

ABSTRACT

Food additives are used with different purposes, including the preservation, coloring and sweetening of food and beverages. Worldwide, over 2,500 different natural or artificial food additives are intentionally added to foods to produce some desired effect, but the use of many of them has been banned in several countries because of their toxicological risk. In order to establish safety parameters for each additive currently used in the market, the Food and Agriculture Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA) uses *in vitro* and *in vivo* laboratory tests as a step to measure the toxicological potential of these substances. However, the toxicity status of many of them remains undefined. In this context and in view of the toxicological knowledge currently available in the literature, this study evaluated the preliminary cytotoxicity of some food additives belonging to the main risk groups pointed out in the literature. Four synthetic sweeteners (acesulfame potassium, aspartame, sodium saccharin and sucralose), two synthetic antioxidants (butylhydroxyanisole and butylhydroxytoluene) and two synthetic food coloring (brilliant blue FCF and tartrazine) were studied in cell proliferation tests with colorimetric endpoint measured by tetrazolium reduction assay (MTT). Samples were tested in human colon epithelial cells (Caco2), human liver cells (HepG2) and fibroblasts (NCTC L929). For each sample was evaluated the cellular viability and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) in the range of 0.13 and 100 mM. The L929 fibroblasts were the cells most frequently affected by the additives evaluated and the Caco2 cell line had its average viability less influenced by the samples. In most samples analyzed, the profiles of the cell viability curves were distinct for the same additive, which influenced the IC₅₀ value of each sample. *In vitro* bioassays have a long history in the screening of toxicity and other physiological responses, since they are easy to handle, have low relative cost, high sensitivity, ability to generate qualitative and quantitative data and allow the observation of the direct effect on the cells. Therefore they are considered as preliminary techniques, which together with other tests, make it possible to predict toxicity to the human organism.

Keywords: Bioassay, Antioxidants, Food coloring, Sweeteners, *In vitro* Toxicity, Food Safety

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1 – Estrutura molecular do acesulfame de potássio	21
Figura 2 - Estrutura molecular do aspartame	22
Figura 3 - Estrutura molecular da sacarina sódica	23
Figura 4 - Estrutura molecular da sucralose	23
Figura 5 - Estrutura molecular do BHA	25
Figura 6 - Estrutura molecular do BHT	26
Figura 7 - Estrutura molecular da tartrazina	27
Figura 8 - Estrutura molecular do azul brilhante FCF	28

LISTA DE ABREVIACOES

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

BHA - Butilhidroxianisol

BHT - Butilhidroxitolueno

BPF - Boas Práticas de Fabricao

Caco2 - Linhagens de células epiteliais de cólon humano

CCFAC - Comitê do Codex para Aditivos Alimentares e Contaminantes

DMSO - Dimetilsulfóxido

EFSA - European Food Safety Authority

FAO - Food and Agriculture Organization

FAPESB - Fundao de Amparo  Pesquisa do Estado da Bahia

FBS - Soro Fetal Bovino

FDA - Food and Drug Administration

FIOCRUZ - Fundao Oswaldo Cruz

HepG2 - linhagens de células hepáticas humanas

IARC - Agencia Internacional de Investigao sobre o Câncer

IC₅₀ - Concentrao inibitória 50%

IDA - Ingestão Diária Aceitável

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

ISO - International Standard Organization

ITIC - International Toxicology Information Centre

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

MEM - Meio Mínimo Essencial

mM - Milimolar

MTT - Ensaio de reduo do sal de tetrazólio

NCTC L-929 - Linhagens de fibroblastos de tecido conjuntivo

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

RIVM - National Institute of Public Health and Environmental Protection

ROS - Espécies reativas ao oxigênio

SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

SCF - Comitê Científico de Alimentação Humana

USPTO - United States Patent and Trademark Office

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO I: Revisão da Literatura	
1. ADITIVOS ALIMENTARES: DEFINIÇÃO E APLICABILIDADE	15
2. SEGURANÇA NO USO DOS ADITIVOS ALIMENTARES	16
3. PERMISSÕES E BANIMENTOS	18
4. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	18
5. ADOÇANTES/EDULCORANTES SINTÉTICOS	19
6. ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	23
7. CORANTES SINTÉTICOS	25
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO II: Aplicação dos aditivos alimentares sintéticos: uma prospecção tecnológica	
1. INTRODUÇÃO	34
2. METODOLOGIA	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO III: Citotoxicidade dos Aditivos Alimentares Sintéticos mais presentes na dieta do Brasileiro	
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Amostras.....	45
2.2. Preparo das amostras.....	45
2.3. Cultura e manutenção celular.....	46
2.4. Ensaio de redução do sal de tetrazólio – MTT.....	46
2.5. Análise dos Resultados.....	47
3. RESULTADOS.....	47
3.1. Edulcorantes	47

3.2. Antioxidantes	48
3.3. Corantes	50
4. DISCUSSÃO.....	52
4.1. Edulcorantes.....	52
4.2. Antioxidantes.....	56
4.3. Corantes.....	59
5. CONCLUSÃO.....	61
6. AGRADECIMENTOS.....	62
REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

Os aditivos alimentares são recursos tecnológicos consagrados pela indústria de alimentos, imprescindíveis para aumentar a vida de prateleira dos mesmos, além de conferir coloração, adoçamento e outras características desejáveis aos produtos alimentares. Por outro lado, o aumento na quantidade e variedade de aditivos alimentares, como consequência do aumento no consumo de produtos industrializados, vem preocupando as autoridades de saúde no que diz respeito à segurança alimentar.

O aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças do aparelho circulatório, diabetes e neoplasias, assim como reações adversas agudas ou crônicas, como alergias, alterações no comportamento (transtorno de déficit de atenção e hiperatividade) e carcinogenicidade a longo prazo, vem sendo relacionado à exposição a alguns aditivos alimentares, principalmente em crianças que são os maiores consumidores de alimentos ricos em aditivos (POLÔNIO & PERES, 2009), gerando assim gastos com internações e tratamentos medicamentosos para o sistema de saúde pública.

A agência sanitária norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) apresenta, para a maioria dos aditivos alimentares, objetos desse estudo, um parecer inconclusivo acerca dos efeitos a nível celular e sistêmico causados pelo seu consumo e sugere que mais pesquisas sejam realizadas quanto ao seu potencial toxicológico (FDA, 2017).

De acordo com a literatura, pode-se observar que, dentre as 23 classes de aditivos alimentares descritas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 1997), os antioxidantes, corantes e edulcorantes são apontados como os grupos de aditivos alimentares que apresentam as substâncias que mais oferecem risco para saúde dos consumidores a curto, médio e longo prazo por estarem associados à toxicidade, genotoxicidade e carcinogênese. Portanto, mesmo que, sob o ponto de vista tecnológico, os aditivos alimentares sejam vantajosos para inúmeros entraves que permeiam a qualidade e durabilidade dos alimentos, as discussões sobre a sua necessidade e a segurança do seu uso devem sim ser levadas em consideração, já que, segundo estudos, existe a possibilidade de riscos toxicológicos potenciais decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas (IVERSON, 1995; KARSTADT et al., 2006; RODERO, RODERO & AZOUBEL, 2009; AMCHOVA, KOTILOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015).

Nesse contexto e diante dos conhecimentos toxicológicos atualmente disponíveis na literatura, fica evidente a necessidade de mais estudos nesta área, a fim de gerar dados que permitam avaliar o real potencial toxicológico dos grupos de aditivos alimentares que, de acordo com a literatura, mais oferecem riscos para saúde dos consumidores a curto, médio e longo prazo.

Esta dissertação está estruturada em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta a revisão da literatura, o segundo trata de uma prospecção tecnológica de patentes com o tema “Aplicação dos aditivos alimentares sintéticos: uma prospecção tecnológica” e o terceiro se refere a avaliação de citotoxicidade de aditivos alimentares em diferentes tipos celulares.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade de aditivos químicos alimentares.

2.2. Objetivos Específicos

Identificar, de acordo com a literatura científica, as classes dos aditivos alimentares que oferecem riscos para os consumidores;

Realizar testes *in vitro* de viabilidade em células do epitélio intestinal (Caco2), células hepáticas (HepG2) e de fibroblastos de tecido conjuntivo (NCTC L-929) por meio da redução do sal de tetrazólio (MTT);

Confrontar os dados da literatura com os obtidos nos testes do presente estudo;

Determinar o potencial citotóxico dos aditivos alimentares com base nos valores da Ingestão Diária Aceitável (IDA);

Discutir, a luz dos conhecimentos científicos disponíveis e da legislação brasileira vigente, sobre possíveis ajustes para cada aditivo alimentar avaliado.

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura

1. ADITIVOS ALIMENTARES: DEFINIÇÃO E APLICABILIDADE

Desde o século XX até os dias atuais a estrutura familiar, como célula social, vem se moldando aos padrões de vida no que diz respeito à sua rotina alimentar. Fatores como a inserção da mulher no mercado de trabalho e o aumento da carga horária de atividades laborais acarretaram em mudanças nos hábitos alimentares de toda a família que, cada vez mais, prima por refeições rápidas, práticas e fáceis de preparar. Para tanto, a indústria de alimentos, com o auxílio das novas tecnologias, vem suprindo esta demanda de mercado, aumentando o tempo de vida de prateleira dos alimentos, principalmente com o uso crescente de aditivos alimentares (KINSEY, 1994; BRANEN et al., 2002).

Em concordância com o Codex Alimentarius, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da portaria 540 - SVS/MS de 27 de outubro de 1997, define o termo aditivo alimentar como "qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparo, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento". Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 1997; CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

A utilização dos aditivos alimentares, portanto, justifica-se por razões tecnológicas, sanitárias, nutricionais ou sensoriais, visando sempre a preservação da qualidade dos alimentos, porém a utilização segura dos mesmos é fundamental. Sendo assim, os aditivos alimentares devem ser empregados na menor concentração possível, mas em quantidade suficiente para alcançar o efeito desejável. Seu uso não deve causar danos à saúde dos consumidores ou promover interferências no valor nutritivo do alimento, nem encobrir falhas no processo de produção ou em adulterações dos alimentos, além de não poderem induzir os consumidores ao erro. Para tanto, sua utilização deve ser limitada a alimentos específicos em estrita observação às Boas Práticas de Fabricação (BPF) estabelecidas pela legislação brasileira (BRASIL, 1997; CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

Ainda de acordo com a Portaria Ministerial de 1997, são reconhecidas no Brasil 23 funções de aditivos alimentares, listadas no quadro abaixo (Quadro 1), e aproximadamente 355 aditivos alimentares são legalmente permitidos para consumo humano, sendo esta listagem passível de sofrer alterações de acordo com os avanços da ciência e tecnologia (BRASIL, 1997; BRASIL, 2010).

Quadro 1 –Função de Aditivos Alimentares

Função	Descrição
Agente de Massa	Proporciona o aumento de volume e/ou da massa dos alimentos, sem contribuir significativamente para o valor energético do alimento.
Antiespumante	Previne ou reduz a formação de espuma.
Antiumectante	Reduz as características higroscópicas dos alimentos e diminuir a tendência de adesão, umas às outras, das partículas individuais.
Antioxidante	Retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento.
Corante	Confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento.
Conservador	Impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas.
Edulcorante	Substância diferente dos açúcares que confere sabor doce ao alimento.
Espessantes	Aumenta a viscosidade de um alimento.
Geleificante	Confere textura através da formação de um gel.
Estabilizante	Mantém a dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento.
Aromatizante	Confere propriedades aromáticas e/ou sápidas, capazes de conferir ou reforçar o aroma e/ou sabor dos alimentos.
Umectante	Protege os alimentos da perda de umidade em ambiente de baixa umidade relativa ou que facilita a dissolução de uma substância seca em meio aquoso.
Regulador de Acidez	Altera ou controla a acidez ou alcalinidade dos alimentos.
Acidulante	Aumenta a acidez ou confere um sabor ácido aos alimentos.
Emulsionante/Emulsificante	Formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento.
Melhorador de Farinha	Melhora a qualidade tecnológica da farinha para os fins a que se destina.
Realçador de Sabor	Ressalta ou realça o sabor/aroma de um alimento.
Fermento Químico	Liberam gás e, desta maneira, aumentam o volume da massa.
Glaceante	Confere uma aparência brilhante ou um revestimento protetor.
Agente de Firmeza	Mantém os tecidos de frutas ou hortaliças firmes ou crocantes, ou interage com agentes geleificantes para produzir ou fortalecer um gel.
Sequestrante	Forma complexos químicos com íons metálicos.
Estabilizante de cor	Estabiliza, mantém ou intensifica a cor de um alimento.
Espumante	Formação ou a manutenção de uma dispersão uniforme de uma fase gasosa em um alimento líquido ou sólido.

Fonte: Brasil, 1997

2. SEGURANÇA NO USO DOS ADITIVOS ALIMENTARES

O uso de aditivos alimentares é determinado e regulamentado por legislação específica de cada país. O Brasil, no que tange os pedidos de inclusão e exclusão de aditivos ou de extensão de seu uso, segue as referências do Codex Alimentarius e da União Européia, podendo também ser considerados como complementares o que está estabelecido pelo *Food and Drug Administration* (FDA - EUA) ou ainda por outros órgãos reconhecidos internacionalmente, como a *International Agency* (IARC), o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), *National Institute of Public Health and Environmental Protection* (RIVM) e o *International Toxicology Information Centre* (ITIC) (BRASIL, 1997).

O Codex Alimentarius, através do Comitê do Codex para Aditivos Alimentares e Contaminantes (CCFAC), é o órgão responsável pela elaboração de normas relativas ao emprego dos aditivos em alimentos. Tais normas são sustentadas por estudos toxicológicos detalhados que garantem a segurança do consumo de determinado aditivo, a exemplo de ensaios laboratoriais *in vitro* para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade dos compostos, e testes *in vivo* para avaliar fatores adicionais, como a absorção, distribuição metabolismo e excreção dos compostos (ARQUETE, 2009).

Cabe ao JECFA, por sua vez, avaliar os resultados dos estudos para, se aprovado for, determinar as especificações de identidade, pureza e de ingestão de cada aditivo mediante monografias toxicológicas padronizadas (BANNWART, 2000; ARQUETE, 2009).

O limite de ingestão é representado pela Ingestão Diária Aceitável (IDA) que, segundo a ANVISA, é a quantidade estimada de uma substância química, expressa em mg/kg de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente durante toda a vida, sem oferecer risco à saúde, a luz dos conhecimentos toxicológicos disponíveis na época da avaliação. Este conceito, utilizado como parâmetro para determinar a concentração considerada segura de cada aditivo alimentar, baseia-se na premissa de que todas as substâncias químicas são tóxicas, e suas toxicidades variam quanto à natureza do efeito e a quantidade necessária para produzir sinais e sintomas tóxicos. Os valores de IDA, porém, só são atribuídos às substâncias que tem o dossiê toxicológico completo, preparado de acordo com protocolos e exigências estabelecidas previamente, considerando variáveis como a utilização de um mesmo aditivo em uma ampla gama de alimentos e a frequência com a qual estes alimentos são consumidos (ARQUETE, 2009).

É importante frisar que a IDA de um dado aditivo não é definitiva, justificando assim a necessidade da reavaliação constante da mesma, uma vez que novas informações sobre a segurança do aditivo, novos usos da substância no alimento ou novos métodos de fabricação podem surgir. Sasaki e colaboradores (2002) sugerem maiores pesquisas em relação à IDA, já que o experimento evidenciou um potencial genotóxico significativo em doses próximas a IDA sugerida pelo JECFA, principalmente para o grupo dos corantes (ARQUETE, 2009).

Portanto, para que a IDA seja encontrada e a utilização do aditivo alimentar seja autorizada, estes devem antes ser submetidos a uma adequada avaliação toxicológica, em que se deve levar em conta, entre outros aspectos, qualquer efeito acumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso (BRASIL, 1997).

3. PERMISSÕES E BANIMENTOS

Proibições e restrições no uso de aditivos alimentares são impostas em alguns países, em face às evidências científicas. A tartrazina, por exemplo, é autorizada para uso em medicamentos tópicos em grande parte do mundo, a citar Nova Zelândia, Austrália, Estados Unidos, Canadá e Reino Unido, mediante indicação no rótulo, porém é proibida para uso oral na Austrália, decisão governamental subsidiada por pesquisas que alertam seu potencial em causar reações de hipersensibilidade quando a substância é ingerida (*Australian Government Department of Health*, 2014).

O guia de alimentos do Reino Unido apresenta um panorama situacional dos aditivos alimentares no mundo inteiro. Dentro do grupo dos corantes, a tartrazina é proibida para consumo na Noruega e Áustria, já o azul brilhante FCF é proibido para consumo na Áustria, Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Itália, Noruega, Espanha, Suécia e Suíça. Os dois principais antioxidantes sintéticos, BHA e BHT, foram mantidos na União Européia, pressionadas pelas indústrias de alimentos, porém sob restrição e no Japão estes antioxidantes foram banidos desde 1958. A empresa Mc Donalds não utiliza o BHT em seus produtos nos Estados Unidos desde 1986. Quanto ao grupo dos adoçantes, apesar de evidências científicas de carcinogenicidade e/ou outras complicações relacionadas, nenhum país restringe o uso dos adoçantes.

4. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

De acordo com a *International Standard Organization* (ISO), os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são sugeridos como os primeiros testes para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em humanos. Depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ISO, 2009).

Sasaki e colaboradores (2002) apesar de reconhecerem que os ensaios laboratoriais *in vivo* são extremamente importantes para o cálculo da Ingestão Diária Aceitável (IDA), uma vez que a interpretação dos dados obtidos em experimentação com animais são extrapolados para o homem, a fim de mensurar o potencial tóxico do aditivo e a dose que o evidencia, sustentam a teoria da ISO 10993 (ISO, 2009) quando afirmam que o uso de ensaios laboratoriais se justifica pela baixa precisão dos estudos epidemiológicos na avaliação dos riscos toxicológicos causados pelos aditivos alimentares em seres humanos, já que as variáveis não podem ser controladas.

A comprovação da segurança dos alimentos e ingredientes mediante estudos toxicológicos é de extrema relevância, pois estes ensaios contribuem na identificação dos efeitos adversos potenciais, auxiliam na definição das condições de exposição necessárias para produzir tais efeitos, avaliam a relação dose-resposta que produz efeitos adversos, assim como as doses que não produzem tais efeitos e fornecem subsídios para a interpretação dos dados experimentais para fins de avaliação de risco, tais como as informações sobre o modo de ação e sua relevância para humanos além de fornecerem dados sobre metabolismo e toxicocinética (BRASIL, 2013).

Os estudos *in vitro* com cultura de células são utilizados para prever a toxicidade de uma substância em seres humanos, empregando para tanto diversos grupos celulares, como micro-organismos, a exemplo das bactérias e fungos, ou culturas com linhagens celulares humana ou animal, desde que a proliferação celular ocorra e que seja possível sua análise. Estes estudos têm papel fundamental na avaliação da citotoxicidade dos mais variados compostos, substituindo os animais ou, ao menos, servindo como um estudo precedente aos testes *in vivo*, como preconizado pelo programa 3R's (Redução, Refinamento e Substituição), além de que permitem limitar o número das variáveis experimentais e possuem uma execução mais simples e rápida se comparado aos testes *in vivo* (ROGERO et al., 2003).

As metodologias mais utilizadas para avaliação da toxicidade *in vitro* dos aditivos alimentares são o ensaio de viabilidade celular pela redução do sal de tetrazólio (MTT)

para estimativa da citotoxicidade (HAN et al., 2010; ALLEVA et al., 2011; BRAEUNING et al., 2012; VANDGHANOONI et al., 2013; VAN EYK, 2014; ESKANDANI et al., 2014) e o ensaio de cometa para avaliação da genotoxicidade (SASAKI et al., 2002; BANDYOPADHY et al., 2008; VANDGHANOONI et al., 2013; ESKANDANI et al., 2014; VAN EYK, 2014). Outros ensaios como a técnica de difusão em ágar (avaliação qualitativa), o método de incorporação do vermelho neutro (avaliação quantitativa) para avaliação da citotoxicidade (ROGERO et al., 2003) e o Índice mitótico e ensaio de micronúcleos, para avaliação da genotoxicidade (KUS & EROGLU, 2015; POUL et al., 2009; MPOUNTOUKAS et al., 2010) também são descritos na literatura.

5. EDULCORANTES SINTÉTICOS

Os edulcorantes são adoçantes artificiais consumidos por uma grande parcela da população. São substâncias diferentes dos açúcares que também conferem sabor doce ao alimento. São utilizados principalmente com o objetivo de reduzir o índice calórico ou para substituir a sacarose em função do crescente número de diabéticos em todo o mundo (BRASIL, 1997). De acordo com uma pesquisa realizada pelo Conselho de Controle de Calorias nos Estados Unidos, 86% dos americanos consomem algum tipo de adoçante diariamente, dentre os quais a sacarina, o aspartame e a sucralose são apontados como os adoçantes mais consumidos (WHITEHOUSE et al., 2008). Essa mudança de hábito alimentar foi motivada também pelos altos índices de obesidade (MUKHOPADHYAY, MUKHERJEE & CHAKRABARTI, 2000).

Por outro lado, a literatura mostra que os adoçantes artificiais podem apresentar riscos toxicológicos. O acesulfame de potássio (Figura 1), adoçante descoberto em 1967 pela indústria química alemã Hoechst, por exemplo, é um deles (KARSTADT, 2010).

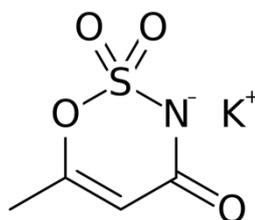


Figura 1 – Estrutura molecular do acesulfame de potássio

Apesar de apresentar características interessantes para o mercado, como estabilidade frente à oscilação de temperatura, não produzir cáries e não ser metabolizado pelo organismo, os ensaios que compõem o dossiê experimental certificando a segurança no uso desse aditivo são considerados inconsistentes, uma vez que sua liberação pelo FDA foi baseada em bioensaios toxicológicos considerados inadequados. Ademais, os estudos clínicos e pré-clínicos feitos para validar a segurança deste edulcorante não estão disponíveis para acesso da comunidade científica (KARSTADT, 2010).

Alguns autores ainda defendem o acesulfame de potássio, afirmando que o aditivo não provoca danos significativos ao DNA (SASAKI et al., 2002), nem apresenta efeitos em estudos de carcinogênese (JEFFREY & WILLIAMS, 2000), porém muitos autores relatam o contrário. Bandyopadhy e colaboradores (2008) verificaram a capacidade do aditivo em interagir com o DNA causando alterações genéticas significativas, mesmo em concentrações abaixo da IDA (MUKHERJEE & CHAKRABART, 1997), além de reduzir a viabilidade celular em ensaio de MTT (VAN EYK, 2014). Já Kim e colaboradores (2015) demonstraram outro aspecto negativo do acesulfame de potássio, sendo este capaz de reduzir a capacidade antioxidante das lipoproteínas isoladas do plasma humano, juntamente com efeitos aterogênicos elevados (formação de placas de ateroma)

O aspartame (Figura 2), descoberto em 1965 por James Schlatter em Searle, consiste em dois aminoácidos, fenilalanina e aspartato, ligados a uma molécula de metanol. Diferentemente do acesulfame de potássio, o aspartame pode ser metabolizado e é estável em ambientes secos, mas sofre degradação em soluções aquosas ou quando submetido a calor prolongado (YANG, 2010).

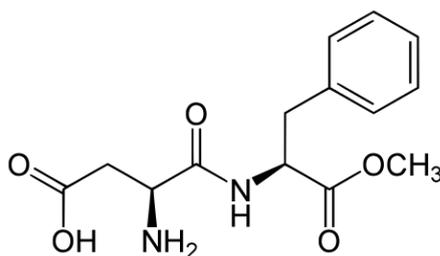


Figura 2 - Estrutura molecular do aspartame

Alguns autores da literatura recente afirmaram que o aspartame pode, além de não ser tóxico, apresentar um potencial antioxidante quando testado em baixas concentrações

(ALLEVA et al.,2011; KIM et al., 2015), porém outros trabalhos mencionam o contrário. PALMNÄS e colaboradores (2014) encontraram uma associação negativa ao consumo de baixas concentrações do aspartame em um modelo animal, podendo estar atrelado ainda ao desenvolvimento da Diabetes tipo 2. Yang (2010), em revisão, expõe trabalhos que fazem associação do consumo regular do aspartame e outros adoçantes artificiais com o aumento de peso, tanto em adultos quanto em crianças e Soffritti e colaboradores (2007) condenam o uso do aspartame por seus ensaios de toxicidade confirmarem o caráter carcinogênico multipotente deste nos níveis próximos a IDA para humanos.

Outros autores creditam ao aspartame um caráter genotóxico (BANDYOPADHY et al., 2008), citotóxico (ALLEVA et al., 2011; VAN EYK, 2014) e cancerígeno multipotente, evidenciando aumento significativo na incidência de câncer em animais, sendo mais expressivo quando a exposição ocorre durante a gestação (SOFFRITTI et al., 2007) porém não afetando a resposta imune de células humanas (RAHIMAN & POOL, 2014).

A sacarina sódica (Figura 3), o adoçante mais antigo no mercado, foi descoberto por Constantine Fahlberg em Johns Hopkins em 1879. Por ter um sabor amargo, era misturado ao ciclamato para melhorar a palatabilidade (YANG, 2010).

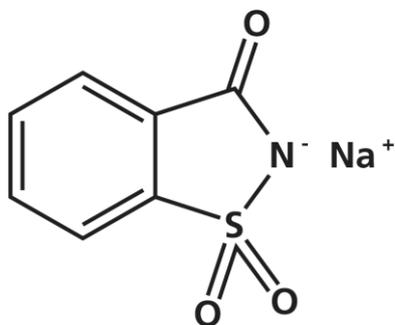


Figura 3 - Estrutura molecular da sacarina sódica

Na literatura as opiniões ainda são muito divergentes sobre a segurança no consumo da sacarina sódica. Em defesa, Jeffrey e Willians (2000) sustentaram a teoria de que a sacarina não é cancerígena, comprovando a não hepatotoxicidade do aditivo a nível de DNA em ratos albinos. Rahiman e Pool (2014) também destacam a não citotoxicidade do aditivo quando testado em leucócitos humanos, observando apenas um efeito supressor na secreção da interleucina-6 (IL-6). Já outros estudos encontraram lesões no estômago e

no cólon de roedores associadas ao consumo de sacarina (SASAKI et al., 2002; BANDYOPADHY et al., 2008) que parece também induzir a fragmentação do DNA, além de reduzir a viabilidade celular com o aumento da concentração e do tempo de incubação, juntamente com a sucralose (VAN EYK, 2014).

A sucralose (Figura 4), o adoçante mais recente dentre os demais, foi descoberto em 1979 por Shashikant Phadnis. É muito estável a altas temperaturas e em meio ácido, insípida e não calórica, não metabolizável e excretada de forma inalterada, majoritariamente pela via fecal (85%) (RODERO et al., 2009).

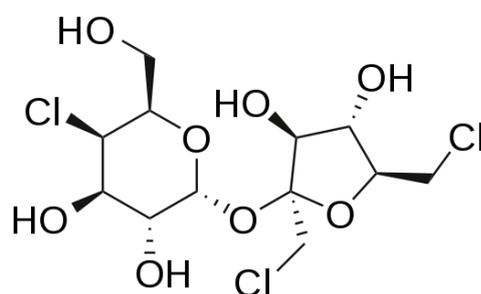


Figura 4 - Estrutura molecular da sucralose

A grande maioria dos autores não encontraram uma associação expressiva de toxicidade da sucralose (JEFFREY & WILLIAMS, 2000) ou mesmo carcinogênese (RODERO, RODERO e AZOUBEL, 2009), porém Van Eyk (2014) contraria os estudos anteriores e aponta a sucralose como citotóxica e genotóxica, além de estar associada a lesões em diferentes órgãos, principalmente gastrointestinais (KILLE et al., 2000; SASAKI et al., 2002). Ademais, não foram observados resultados toxicológicos significativos em outros estudos *in vivo* (RAHIMAN & POOL, 2014), apenas uma redução no ganho de peso dos animais, atribuída à diminuição no consumo de alimentos devido à palatabilidade reduzida decorrente da dieta com a sucralose (MANN et al., 2000).

6. ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

A associação de câncer e outros danos celulares, segundo a literatura, também se aplica aos antioxidantes sintéticos. Estes aditivos alimentares são substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas no alimento (BRASIL, 1997). Normalmente são utilizados em alimentos com alto teor de lipídios, principalmente os ricos em ácidos graxos poli-insaturados que são alvo de processos oxidativos. Substituem os antioxidantes naturais

(por exemplo, vitamina E), em virtude da sua maior resistência a altas temperaturas, e são consumidos por uma grande parcela da população (BRANEN et al., 2001).

De acordo com Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), a obesidade, caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal, atinge cerca de 18 milhões de pessoas no Brasil e, somando o total de indivíduos acima do peso, o montante chega a 70 milhões, o dobro de três décadas atrás, confirmando assim a associação entre o sedentarismo e o aumento do consumo de alimentos ricos em lipídios e, conseqüentemente, antioxidantes sintéticos (SBEM, 2015).

O butilhidroxianisol (BHA) (Figura 5) é classificado como um antioxidante primário ou bloqueador de cadeia, pois possui como mecanismo de ação a doação de hidrogênios ou elétrons para os radicais livres, interrompendo a reação oxidativa em cadeia e resultando na formação de produtos mais estáveis (BANNWART, 2000). Nesse sentido, o BHA, assim como outros fenólicos sintéticos, passaram a ser usados em alimentos, não só como antioxidantes lipídicos, mas também numa perspectiva de moduladores de doenças humanas relacionadas ao envelhecimento, mais precisamente câncer, doenças cardiovasculares, catarata, supressão imunológica, entre outras doenças degenerativas. Porém, alguns estudiosos evidenciaram que o BHA estava relacionado ao desenvolvimento de lesões no esôfago e no fígado de animais e, a depender da dose e do tempo de exposição, estas poderiam evoluir para um carcinoma (IVERSON, 1995).

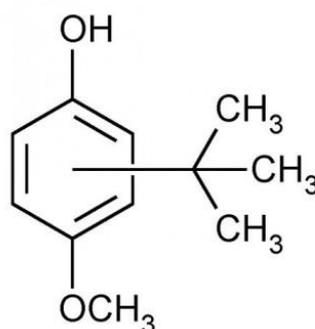


Figura 5 - Estrutura molecular do BHA

De acordo com a literatura o BHA provoca citotoxicidade e genotoxicidade através da fragmentação do DNA, da cromatina e induz apoptose celular (VANDGHANOONI et al., 2013), causando danos ao DNA das células do estômago e do cólon de roedores após 3 horas da sua administração via oral. Outros autores reafirmam o

seu caráter carcinogênico, apesar de discordarem quanto ao seu mecanismo carcinogênico estar atrelado a danos diretos no DNA (WILLIANS et al., 1999)

Em outra perspectiva, os estudos com os antioxidantes fenólicos, em geral, evidenciam a capacidade paradoxal destes compostos em mudar sua função antioxidante para pró-oxidante. Isso ocorre quando as vias de proteção metabólica estão saturadas e a concentração e o ambiente lhes permitem oxidar materiais que têm baixos potenciais eletroquímicos. Pesquisas indicam que o BHA pode sofrer transformações metabólicas que desencadeiam no aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e, conseqüentemente no estresse oxidativo seguido de apoptose ou necrose. O autor ainda alerta para a multiplicidade de vias metabólicas com as quais o BHA pode vir a ter atividade, produzindo efeitos benéficos ou indesejáveis (IVERSON, 1995).

Assim como o BHA, o butilhidroxitolueno (BHT) (Figura 6) também é classificado como um antioxidante primário, sendo usado para preservar e estabilizar o frescor, o valor nutritivo, o sabor e a cor dos alimentos (WILLIANS et al., 1999).

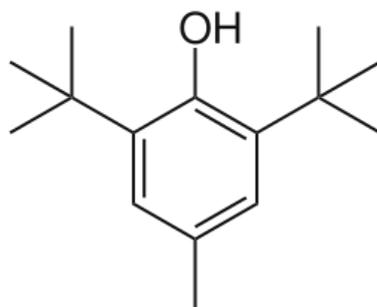


Figura 6 - Estrutura molecular do BHT

Além de provocar danos ao DNA das células do estômago e cólon, o butilhidroxitolueno (BHT) afetou também o DNA das células da bexiga e cérebro (SASAKI et al., 2002), indicando participação significativa na indução de apoptose e danos oxidativos no DNA celular (OIKAWA, 1998). Por outro lado, alguns autores demonstraram aspectos positivo do BHT, através da sua capacidade em reduzir significativamente as aberrações cromossômicas causados pela bleomicina, substância conhecida danosa ao DNA, via prevenção ou redução dos radicais livres produzidos por este composto (GRILLO & DULOUT, 1997) ou apresentando atividade anticarcinogênica em pequenas doses quando administradas antes e durante as exposições a carcinógenos reativos ao DNA (WILLIANS et al., 1999).

7. CORANTES SINTÉTICOS

O grupo dos corantes alimentares artificiais, substâncias que conferem, intensificam ou restauram a cor de um alimento (BRASIL, 1997), em sua maioria oriundos do petróleo e aprovados pelo FDA para o reforço da cor dos alimentos processados, apontam para uma relação entre seu uso indiscriminado e muitos transtornos imunológicos e alérgicos, além de problemas comportamentais em crianças, tais como agressão, transtorno de déficit de atenção e de déficit de atenção/hiperatividade (VOJDANI & VOJDANI, 2015). O consumo de corantes artificiais vem aumentando ao longo dos anos, subindo de 12 mg/*per capita*/dia em 1950 para 68 mg/*per capita*/dia em 2012 (STEVENS et al., 2013), sendo as crianças os maiores consumidores desse grupo de aditivos (MASONE & CHANFORAN, 2015).

A tartrazina (Figura 7), um corante azo que confere a cor amarela aos alimentos, é solúvel em água, quase que completamente excretado de forma inalterada pela urina, mas que pode ser metabolizado pela microflora intestinal (AMCHOVA, KOTOLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015).

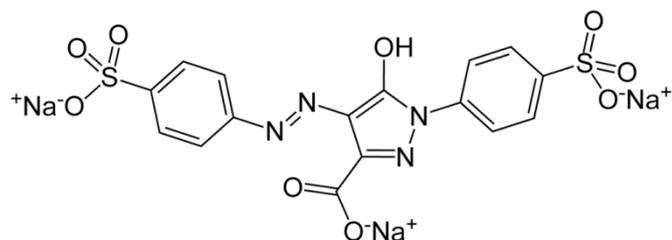


Figura 7 - Estrutura molecular da tartrazina

No ensaio de cometa, a tartrazina mostrou provocar danos ao DNA das células do cólon de roedores após 3 horas da sua administração apesar de não ter sido observado um efeito genotóxico no ensaio de micronúcleos em camundongos, mesmo com altas doses (SASAKI et al., 2002). Estes resultados sugerem que os danos temporários no DNA observados nos estudos de Sasaki e colaboradores (2002) são incapazes de serem fixados em lesões genotóxicas estáveis e podem ser parcialmente explicados pela citotoxicidade local dos corantes (POUL et al., 2009). Outro estudo ainda afirma que a tartrazina pareceu

ser tóxica, porém não apresentando sinais de genotoxicidade (MPOUNTOUKAS et al., 2010).

Para além dos estudos que associam a tartrazina a alterações comportamentais em crianças (POLÔNIO & PERES, 2009), a literatura recente tem estudado o potencial de ligação da tartrazina às proteínas e células humanas e suas consequências funcionais. Ficou confirmada sua capacidade em se ligar à albumina de soro humano e bovino (BASU & KUMAR, 2015) como também a hemoglobina (BASU & KUMAR, 2016). Em ambos os casos, a tartrazina formou um complexo com estas proteínas, limitando potencialmente a sua função fisiológica, podendo controlar a concentração destas proteínas no organismo, ou até mesmo comprometer sua importante função no organismo (MASONE & CHANFORAN, 2015).

Já o azul brilhante FCF (Figura 8), corante trifenilmetano que confere a cor azul aos alimentos, é solúvel em água, quase que completamente excretado de forma inalterada nas fezes, com percentual metabolizável insignificante (AMCHOVA, KOTOLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015).

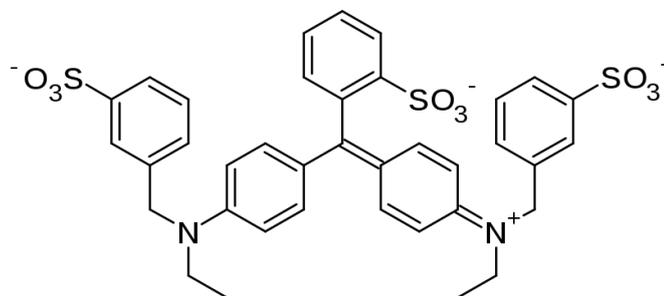


Figura 8 - Estrutura molecular do azul brilhante FCF

Apesar de muitos reajustes nos valores limites de ingestão do azul brilhante FCF (de 12,5 mg/kg/dia em 1975 para 6 mg/kg/dia nos dias atuais), de acordo com avaliações mais recentes feitas pela *European Food Safety Authority* (EFSA), o consumo de doses reduzidas ainda pode causar reações de hipersensibilidade em indivíduos susceptíveis (AMCHOVA, KOTOLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015).

Ademais, o azul brilhante apresentou efeitos genotóxicos e citotóxicos significativos em linfócitos humanos, além de uma diminuição dose dependente nos valores das frequências de índices mitóticos e de micronúcleos (KUS E EROGLU, 2015).

A partir desta revisão, pode-se observar que os estudos disponíveis na literatura apresentam divergência quanto aos resultados obtidos e, portanto, se faz necessário maiores esclarecimentos acerca de potenciais perigos e risco a integridade celular e/ou tecidual provocadas por estes aditivos alimentares. Além disso, muitos dos aditivos alimentares apresentam parecer inconclusivo pelo FDA quanto ao seu potencial citotóxico, carcinogênico e/ou teratogênico.

REFERÊNCIAS

ALLEVA, R.; BORGHI, B.; SANTARELLI, L.; STRAFELLA, E.; CARBONARI, D.; BRACCI, M.; TOMASETTI, M. In vitro effect of aspartame in angiogenesis induction. *Toxicology In Vitro*. v.25, n.1, p.286-93, Feb, 2011.

AMCHOVA, P., KOTOLOVA, H., RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v.73, p.914-22, 2015.

ARQUETE, D. Aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação. ANVISA. GGALI, Brasília-DF, 2009. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/alimentos/aulas/aditivos/aditivos_alimentares.pps>. Acessado em 09 de março de 2015.

Australian Government Department of Health. Version 1.0. Original publication. Office of Scientific Evaluation. Feb 2014. Disponível em: <<http://www.tga.gov.au/book/export/html/4586>>. Acessado em 04 de março de 2017

BANDYOPADHYAY, A.; GHOSHAL, S.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity testing of low-calorie Sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug and Chemical Toxicology*. v.31, n.4, p.447-57, 2008.

BANNWART, G.C.M.C., 2000. Avaliação da ingestão potencial dos antioxidantes butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno e terc-butilhidroquinona. 2000. f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

BASU, A., KUMAR, G.S. Multispectroscopic and calorimetric studies on the binding of the food colorant tartrazine with human hemoglobin. *Journal of Hazardous Materials*. v.318, p.468–76, 2016.

BASU, A., KUMAR, G.S. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. *Food Chemistry*. v.175, p.137–42, 2015.

BRAEUNING, A.; VETTER, S.; ORSETTI, S.; SCHWARS, M. Paradoxical cytotoxicity of tert-butylhydroquinone in vitro: what kills the untreated cells?. *Archives of Toxicology*. v.86, p.1481–7, 2012.

BRANEN, A.L. et al., *Food Additives*. 2ª Ed. Marcel Dekker Inc, 2002. 938 p.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes. GGALI, Brasília, 2013.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n.540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e Emprego. *Diário Oficial União*, Brasília, DF, 28/10/1997. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/POR_TARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em 09 de março de 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC n. 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/>. Acessado em 25 de março de 2016.

CODEX ALIMENTARIUS. General Standard for Food Additives. Codex Stan 192-1995. Adopted in 1995, Revision 1997 [...] 2014.

ESKANDANI, M.; HAMISHEHKAR, H.; DOLATABADI, J.E.N. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chemistry*. v.153, p.315-20, jun, 2014.

GRILLO, C.A., DULOUT, F.N. The effect of butylated hydroxytoluene on the chromosomal damage induced by bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*. v.375, p.83–89, 1997.

HAN, Y.H.; MOON, H.J.; YOU, B.R.; PARK, W.H. Propyl gallate inhibits the growth of calf pulmonary arterial endothelial cells via glutathione depletion. *Toxicology In Vitro*. v.24, n.4, p.1183-9, jun, 2010.

International standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5, 2009.

IVERSON, F. Phenolic antioxidants: health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. *Cancer Letters*. v.93, p.49-54, 1995.

JEFFREY, A.M., WILLIAMS, G.M. Lack of DNA-damaging Activity of Five Non-nutritive Sweeteners in the Rat Hepatocyte/DNA Repair Assay. *Food and Chemical Toxicology*. v.38, p.335-38, 2000.

KARSTADT, M. Inadequate Toxicity Tests of Food Additive Acesulfame. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. v.6, p.89–96, 2010.

KILLE, J. W.; TESH, J.M.; McANULTY, P. A.; ROSS, F. W.; WILLOUGHBY, C. R.; BAILEY, G. P.; WILBY, O. K.; TESH, S. A. Sucralose: Assessment of teratogenic potential in the rat and rabbit. *Food and Chemical Toxicology*. v.38, n.2, p.43-52, 2000.

KIM, J.Y., PARK, K., KIM, J., CHOI, I., CHO, K. Modified High-Density Lipoproteins by Artificial Sweetener, Aspartame, and Saccharin, Showed Loss of Anti-atherosclerotic Activity and Toxicity in Zebrafish. *Cardiovascular Toxicology*. v.15, p,79–89, 2015.

KINSEY, J.D. Food and Families ‘Socioeconomic Status’. *Journal of Nutrition*. Sept, 124 (9 Suppl), 1994.

KUS, E. & EROGLU, H.E. Genotoxic and cytotoxic effects of Sunset Yellow and Brilliant Blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.28, n.1, p.227-30, jan, 2015.

MANN, S. W.; YUSCHAK, M. M.; AMYES, S. J. G.; AUGHTON, P.; FINN, J. P.A combined chronic toxicity/carcinogenicity study of sucralose in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*.v.38, n.2, p.71-89, 2000.

MASONE, D., CHANFORAN,C. Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational Biology and Chemistry*. v.56, p.152–58, 2015.

MPOUNTOUKAS, P.; PANTAZAKI, A.; KOSTARELI, E.; CHRISTODOULOU, P.; KARELI, D.; POLILIOU, S.; MOURELATOS, C.; LAMBROPOULOU, V.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*. v.48, n.10, p.2934-4, Oct, 2010.

MUKHERJEE, A. & CHAKRABATI, J. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K--a non-nutritive sweetener. *Food and Chemical Toxicology*. v.55, n.12, p.1177-9, Dec, 1997.

OIKAWA, S.; NISHINO, K.; OIKAWA, S.; INOUE, S; MIZUTANI, T.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA Damage and Apoptosis Induced by Metabolites of Butylated Hydroxytoluene. *Biochemical Pharmacology*. v.56, p.361–70, 1998.

PALMNAS, M.S.A., COWAN, T.E., BOMHOF, M.R., SU, J., REIMER, R.A., VOGEL, H.J., HITTEL, D.S., SHEARER, J. Low-Dose Aspartame Consumption Differentially Affects Gut Microbiota-Host Metabolic Interactions in the Diet-Induced Obese Rat. *PlosOne*.9. v.9, n.10, 2014.

POLÔNIO, M.L.T., PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Caderno de Saúde Pública*.v.25, n.8, p.1653-6, 2009.

POUL, M.; JARRY, G.; ELHKIM, M.O.; POUL, J.M. 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*. v.47, p.443-48, 2009.

RAHIMAN, F. & POOL, E.J. The in vitro effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. *Journal of Immunoassay and Immuno chemistry*.v.35, n.1, p.26-36, 2014.

RODERO, A.B., RODERO, L.S., AZOUBEL, R. Toxicity of Sucralose in Humans: A Review. *International Journal of Morphology*. v.27, n.1, p.239-44, 2009.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*. v.6, n.3, p.317-20, 2003.

SASAKI, Y.F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*. v. 519, p.103-19, 2002.

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/>>. Acessado em 30 de março de 2015.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; TIBALDI, E.; ESPOSTI, D.D.; LAURIOLA, M. Life-Span Exposure to Low Doses of Aspartame Beginning during Prenatal Life Increases Cancer Effects in Rats. *Environmental Health Perspectives*. v.115, n.9, p.1293-7, sept, 2007.

STEVENS, L.J., KUCZEK, T., BURGESS, J.R., STOCHESKI, M.A., ARNOLD, L.E., GALLAND, L. Mechanisms of behavioral, atopic, and other reactions to artificial food colors in children. *Nutrition Reviews*. v.71, n.5, p.268-81, 2013.

The UK Food Guide. Disponível em: <<http://www.ukfoodguide.net/index.htm>>. Acessado em 30 de março de 2017.

VAN EYK, A.D. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology*. v.15, p.1-10, Oct, 2015.

VANDGHANNONI, S.; FOROUHARMEHR, A.; ESKANDANI, M.; BARZEGARI, A.; KAFIL, V.; KASHANIAN, S.; DOLATABADI, J.E.N. Cytotoxicity and DNA Fragmentation Properties of Butylated Hydroxyanisole. *DNA and Cell Biology*. v.32, n.3, p.98-103, Mar, 2013.

VOJDANI, A. & VOJDANI, C. Immune reactivity to food coloring. *Alternative Therapies*.v.21, n.1, p.52-62, 2015.

WHITEHOUSE, C.R.; BOULLATA, J.; MCCAULEY, L.A. The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *AAOHN Journal*. v.56, n.6, jun, 2008.

WILLIAMS, G. M., IATROPOULOS, M. J., WHYSNER, J. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. *Food and Chemical Toxicology*. v.37, p.1027-8, 1999.

YANG, Q. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. *Yale Journal of Biology and Medicine*. v.83, p.101-08, 2010.

CAPÍTULO 2

Aplicação dos aditivos alimentares sintéticos: uma prospecção tecnológica

(Apresentado e publicado nos anais do “VI Workshop PTI e II Simpósio Internacional SIINTEC - SENAI”)



APLICAÇÃO DOS ADITIVOS ALIMENTARES SINTÉTICOS: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

Flávia C. B. Lacerda¹, Carolina O. Souza², Cleber A. Schmidt³

¹Mestranda do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, E-mail: fcb.lacerda@hotmail.com;

² Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, E-mail: carolinaods@hotmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, E-mail: cas1375@gmail.com

APPLICATION OF SYNTHETIC FOOD ADDITIVES: A TECHNOLOGICAL PROSPECTION

Resumo: *Por serem mais disponíveis e baratos, os aditivos sintéticos atualmente são uma alternativa interessante para uso em escala industrial, em detrimento dos aditivos naturais, porém o consumo indiscriminado destes têm sido visto com maus olhos pela comunidade científica, mesmo com sua seguridade atestada. O presente trabalho visou avaliar o estado da técnica dos aditivos alimentares sintéticos e sua produção/aplicações no mercado industrial a partir de dados de patentes. Apesar do novo conceito de saúde contemporânea se observou nos últimos 30 anos uma tendência de mercado em produzir alimentos ricos em aditivos sintéticos utilizados para melhorar a qualidade nutricional, sensorial e sanitária dos alimentos.*

Palavras-Chaves: *Aditivo; Alimentar; Sintético; Prospecção.*

Abstract: *Because its availability and cost, synthetic food additives are currently an interesting alternative for use in industrial scale, being preferred than the natural additives, but the indiscriminate use of these chemical substances have been frowned upon by the scientific community, even with its certified safety. Using patent data, this study aimed to evaluate the technical state of the synthetic food additives and production / applications in the industrial market. Despite the new concept of contemporary health, it was observed in the last 30 years a market trend in producing foods rich in synthetic additives used to improve the nutritional and sensory aspects, as well as, the food sanitary quality.*

Keywords: *Additive; Food; Synthetic; Prospection.*

1. INTRODUÇÃO

Tão antigos quanto à humanidade, os aditivos alimentares sempre estiveram presentes na dieta e, com o passar do tempo, estão sendo cada vez mais utilizados. Além da preocupação com a inocuidade, o sabor, a aparência, o odor e principalmente a estabilidade dos produtos passaram a ser ambicionados pela indústria de alimentos [1]. Pressionada pelo mercado consumidor do século XXI, que anseia por refeições práticas e com uma maior vida de prateleira, associado ao suporte das novas tecnologias de alimentos, a indústria investe cada vez mais no uso de aditivos alimentares [2,3].

O primeiro registro de patente relacionada aos Aditivos Alimentares Sintéticos foi depositado na área das ciências médicas pela indústria de negócios American General Enterprise INC em 1971, porém no ano de 1973, foi depositada a primeira patente voltada para o campo da indústria de alimentos e registra um novo aditivo alimentar aromatizante que agrega um sabor de leite fresco aos alimentos, dando início a uma nova geração de alimentos industrializados.

Em concordância com o Codex Alimentarius, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da portaria nº 540 - SVS/MS de 27 de outubro de 1997, define o termo Aditivo alimentar como “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparo, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais” [4,5].

A utilização dos aditivos alimentares, portanto, justifica-se por razões tecnológicas, sanitárias, nutricionais e/ou sensoriais, visando sempre à preservação da qualidade dos alimentos, sendo empregados para diversas finalidades, a exemplo da conservação, coloração, adoçamento e espessamento dos produtos alimentícios [5].

Por serem mais disponíveis e baratos, os aditivos sintéticos atualmente são uma alternativa interessante para uso em escala industrial, em detrimento dos aditivos naturais, porém o consumo indiscriminado de alimentos ricos em aditivos sintéticos tem sido visto com maus olhos pela comunidade científica e pela sociedade, mesmo com sua segurança atestada pela Food and Drug Administration.

O aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, a exemplo das doenças do aparelho circulatório, diabetes e neoplasias, assim como reações adversas agudas ou crônicas, como alergias, alterações no comportamento e carcinogenicidade a longo prazo, vem sendo relacionadas à exposição de alguns aditivos alimentares, principalmente em crianças, os maiores consumidores de alimentos ricos em aditivos [6], gerando assim gastos com internações e tratamentos medicamentosos para o sistema de saúde pública.

Ademais, o conceito de vida saudável, preconizado pelo Ministério da Saúde, baseado na nova pirâmide alimentar brasileira, está cada vez mais associado à redução do consumo de alimentos industrializados rico em aditivos, atrelados ao aumento da ingestão de água e produtos naturais e a prática de exercícios físicos regulares.

A partir desse contexto, o presente trabalho visou avaliar o estado da técnica dos aditivos alimentares sintéticos e sua produção e aplicações no mercado industrial a partir de dados de patentes.

2. METODOLOGIA

Essa prospecção tecnológica foi desenvolvida a partir de consulta ao banco de patentes do *Espacenet*, considerando todos os documentos encontrados, independente do período de tempo. A escolha pela utilização deste banco de patentes se justifica pelo fato de o *Espacenet* ser considerado o maior banco de depósito de patentes do mundo, abrangendo patentes depositadas e publicadas em mais de 80 países, incluindo os pedidos de patentes depositados no Brasil (INPI) e nos EUA (USPTO). Portanto, o mais adequado para desenvolver uma prospecção tecnológica mais analítica. O estudo foi feito utilizando as palavras-chaves Food*, Additive* e Synthetic*, podendo ser encontradas tanto no título quanto no resumo. Foram encontrados 135 documentos de patentes, as quais foram analisadas em Novembro de 2015.

Após a busca e a tabulação dos dados, foram realizadas as análises quanto ao número de documentos patentes por código de classificação internacional, a distribuição dos depósitos de documentos de patente ao longo dos últimos 30 anos e os escritórios de prioridade dos depósitos de documentos de patentes.

Diante desses resultados, foi feito um levantamento de dados com as principais informações dos documentos de patentes encontradas e, por fim, foi gerado um gráfico com as áreas de aplicação das mesmas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 evidencia a relação entre o número de documentos de patentes e a sua referida classificação no código de identificação internacional (Quadro 1).

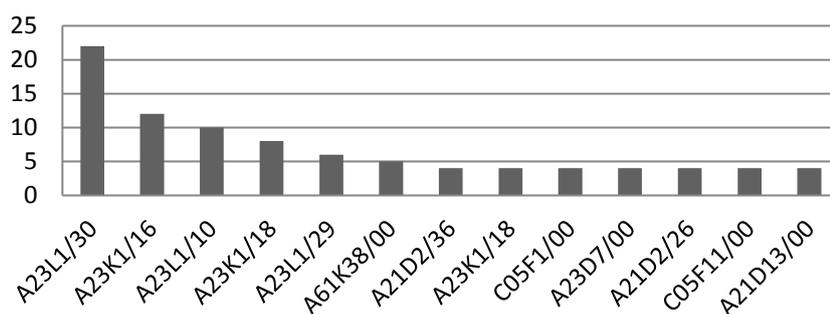


Figura 1 – Número de documentos de patentes por código de classificação internacional. Autoria própria, 2015.

Quadro 1 – Identificação dos códigos de Classificação Internacional

A23L1/30	Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas, seu preparo ou tratamento, conservação de alimentos ou produtos alimentícios em geral; contem aditivos alimentares
A23K1/16	Produtos alimentícios especialmente adaptados para animais; métodos especialmente adaptados para a produção dos mesmos; produtos complementados por fatores alimentícios acessórios
A23L1/10	Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas, seu preparo ou tratamento, conservação de alimentos ou produtos alimentícios em geral; produtos derivados de cereais
A23K1/18	Produtos alimentícios especialmente adaptados para animais; métodos especialmente adaptados para a produção dos mesmos; especialmente adaptados para animais determinados
A23L1/29	Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas, seu preparo ou tratamento, conservação de alimentos ou produtos alimentícios em geral; dietéticos

Na Figura 1 merece destaque os segmentos “Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas, seu preparo ou tratamento, conservação de alimentos ou produtos alimentícios em geral”, representados pelo código A23L1, com 22 patentes relacionadas a produtos que contem aditivos alimentares, seguidos de produtos derivados de cereais e os dietéticos, com 10 e 6 patentes, respectivamente, o que já era esperado, levando em consideração o escopo da pesquisa.

Porém, outro segmento, o de “Produtos alimentícios especialmente adaptados para animais; métodos especialmente adaptados para a produção dos mesmos”, representado pelo código A23K1, aparece com um número considerável de documentos registrados, a citar os produtos complementados por fatores alimentícios acessórios (12) e os especialmente adaptados para animais determinados (8).

Esse achado encontra-se em evidência quando feita a análise das aplicações dos documentos de patentes, expressa pela Figura 2. O setor de agroindústria representa 10% do total de registros e, em análise, foi verificado um forte interesse na utilização de aditivos para a elaboração de misturas com a finalidade de engorda e/ou melhoramento animal, principalmente no que diz respeito à qualidade da carne. Esse dado corrobora com o aumento no investimento tecnológico no setor de agroindústria em resposta a demanda do mercado consumidor [7].

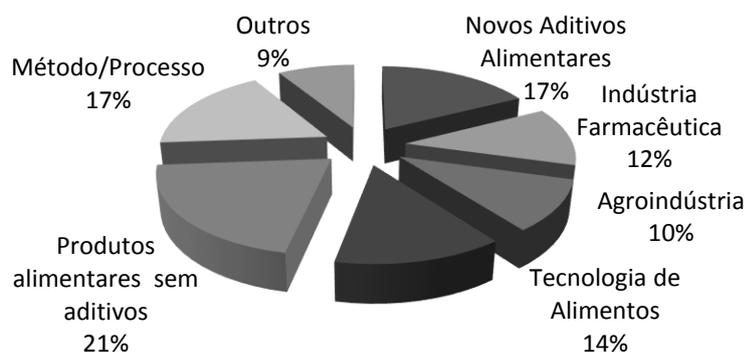


Figura 2 – Áreas de aplicação. Autoria própria, 2015.

Ainda sobre a Figura 2, vale ressaltar: (1) O interesse da indústria de alimentos na elaboração de produtos sem aditivos sintéticos; (2) os métodos/novas técnicas de preparo de aditivos alimentares, que visam principalmente à redução de custos e de tempo de processo; (3) As tecnologias ligadas ao uso de aditivos alimentares, a exemplo da técnica de encapsulamento, o desenvolvimento de películas comestíveis que liberam aditivos alimentares, embalagens ativas/inteligentes, etc.; (4) os aditivos voltados principalmente para a indústria farmacêutica, mas que também podem ser utilizados na indústria cosmética e de alimentos, e ainda uma pequena parcela de registros alheios ao tema, classificados como outros.

Nesses, foram encontrados fluidos combustíveis produzidos a partir de lixo acrescido de aditivo; aplicação da engenharia genética para produzir novo microorganismo com maior eficiência na síntese de vitamina B2, o qual pode ser utilizado como um aditivo alimentar, entre outros.

Pressionados pela economia e sustentados pelos avanços tecnológicos, de forma geral, todos esses achados procuram responder as novas tendências do mercado industrial de alimentos, atrelados ou não a outros segmentos, como o farmacêutico ou cosmético, como já mencionado acima.

A Figura 3 mostra as classes de aditivos alimentares sintéticos que mais tem atraído o mercado industrial.

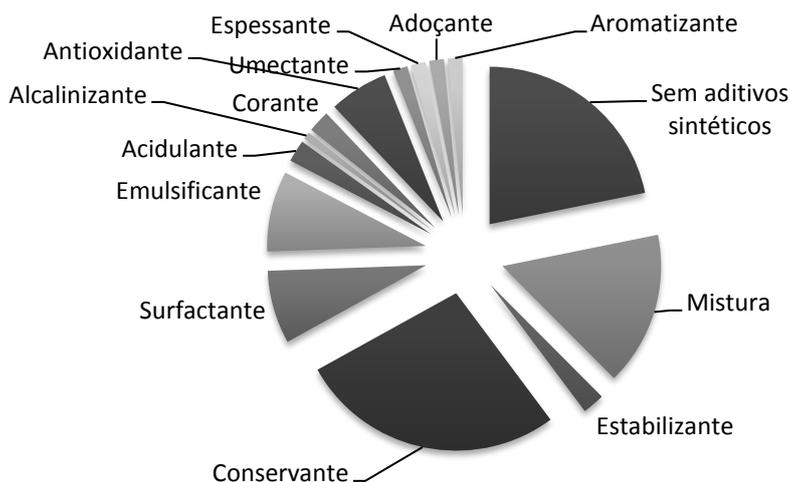


Figura 3 – Principais classes de Aditivos Alimentares. Autoria própria, 2015.

De forma geral, o mercado industrial tem investido mais nos conservantes, seguidos dos produtos livres de aditivos sintéticos e dos compostos ou misturas. A classificação como conservante se deu no sentido amplo, mas, em sua grande maioria, os mesmos estão sendo utilizados no campo da agroindústria com funções antiinflamatórias ou antimicrobianas, funcionando como promotores de crescimento, para melhorar as características organolépticas da carne, para compor embalagens, comestíveis ou não, e para melhorar as características de proteção.

Foi observado também que grande parte das patentes encontradas diz respeito, em sua essência, a outras áreas do conhecimento que, em algum momento, se utilizam dos aditivos sintéticos na sua composição/processo. Além disso, muitas vezes os aditivos sintéticos possuem não apenas aplicações em alimentos, mas também na indústria farmacêutica e cosmética, para tratamento de enfermidades em geral.

Todas as patentes relacionadas ao ganho de peso dos animais foram alocadas na classe de alimentos 'conservante', sejam eles antimicrobianos, promotores de crescimento ou quaisquer substâncias afins.

As patentes que tratam de substâncias enriquecidas foram enquadradas em mistura, a exemplo do iodo em compostos orgânicos diversos. Ainda dentro desse grupo, foram encontradas patentes para finalidades alimentares ou outras, como produção de combustível.

No grupo dos antioxidantes, foram alocados os propriamente ditos, os materiais com propriedades antioxidantes ou substâncias que induzem a sua produção no corpo.

Na classe dos emulsificantes, os trabalhos estão relacionados à composição de filmes para fins de conservação de frutas.

A Figura 4 apresenta os países depositantes dos documentos de patentes em análise.

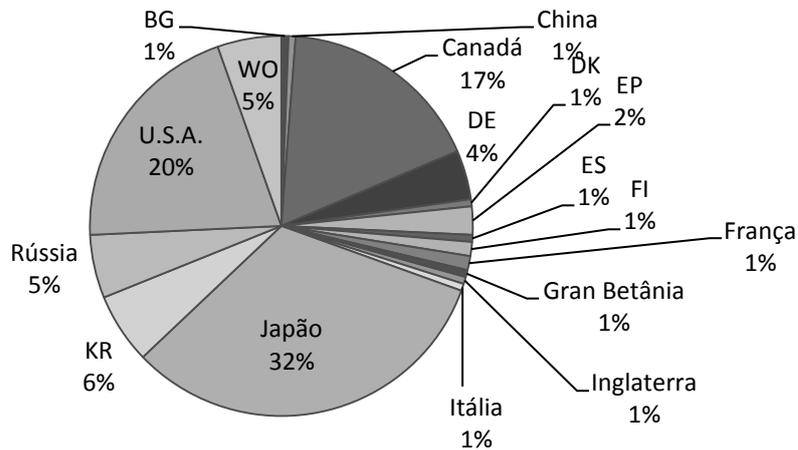


Figura 4 – Distribuição de depósitos de documentos de patentes por país de origem da tecnologia. Autoria própria, 2015.

Os dados dos escritórios com maior número de depósitos, o Japão, Estados Unidos e Canadá, respectivamente, corroboram com o nível de investimento destes países em novas tecnologias, não só no segmento alimentar, como também na construção civil, indústria bélica, informática, no comércio, entre outros. É de interesse dos EUA, por exemplo, a produção de aditivos alimentares, uma vez que sete dentre as onze maiores indústrias de alimentos no mundo são americanas (Nestlé, Pepsico, General Mills, Kellogg's, Mondelez, Wrigley, Mars e Coca-cola).

A Figura 5 mostra a evolução anual dos depósitos de patentes registradas por ano desde o primeiro registro encontrado.

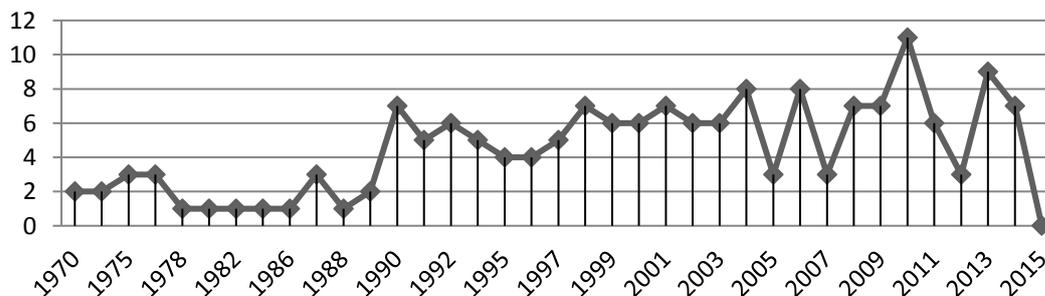


Figura 5 - Distribuição dos depósitos de patente ao longo dos anos. Autoria própria, 2015.

Nota-se um aumento dos registros de patentes a partir dos anos 1990. Nesse período, a regularidade e igualdade na oferta dos alimentos, além da sua adequação higiênica estavam muito aquém do considerado seguro. Partindo do pressuposto de que os aditivos alimentares assumem um importante papel na conservação e controle microbiológico alimentar, acredita-se, portanto, que esse avanço esteja associado ao início do desenvolvimento de processos técnicos para conservação de alimentos a nível industrial [8] associado a um maior controle de qualidade e higiene alimentar, imprescindíveis para a redução das taxas de mortalidade associadas a doenças veiculadas por alimentos (DVA), haja vista uma melhora no panorama da saúde e conseqüentemente da economia mundial.

Para fins regulamentares, em 1997 e 1999, a Food and Agriculture Organization (FAO), junto a Organização Mundial de Saúde (OMS), implementou os princípios gerais que estabelecem uma base sólida para garantir a higiene dos alimentos em todo o mundo, o que reforça o argumento acima.

4. CONCLUSÃO

Os aditivos alimentares sintéticos estão presentes em praticamente todos os alimentos processados e industrializados atualmente disponíveis no mercado, principalmente e com maior intensidade desde a década de 90. Portanto, podem ser considerados como um recurso tecnológico importante no controle da qualidade dos produtos alimentícios e, conseqüentemente, no controle das doenças veiculadas por alimentos. Ademais, são empregados também para melhorar características nutricionais e/ou sensoriais dos produtos.

A partir da análise dos dados e, apesar do novo conceito de saúde e qualidade de vida atual, pôde-se observar nos últimos 30 anos uma tendência de mercado voltada para a produção de alimentos ricos em aditivos sintéticos utilizados para melhorar a qualidade nutritiva, sensorial e sanitária dos alimentos. Nota-se também uma grande quantidade de registros de patentes voltadas para a indústria agropecuária, no que tange a alimentação animal e melhora do seu desempenho, como também grandes investimentos em tecnologias de conservação e melhoria nos processos, visando o lucro. Quanto aos maiores depositantes, destacam-se as principais potências mundiais detentoras das indústrias de alimentos e das tecnologias voltadas para este segmento.

5. REFERÊNCIAS

- ¹AUN, M. V et al. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 34, n. 5, p. 177–186, 2011.
- ²BRANEN, A. L. et al. **Food Additives**. [s.l: s.n.].
- ³KINSEY, J. D. Food and families' socioeconomic status. **The Journal of nutrition**, v. 124, n. 9 Suppl, p. 1878S–1885S, set. 1994.
- ⁴CODEX ALIMENTARIUS. General Standard for Food Additives. Codex Stan 192-1995. Adopted in 1995, Revision 1997 [...] 2014;
- ⁵BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n.540, de 27 de outubro de 1997
- ⁶POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. [Food additive intake and health effects: public health challenges in Brazil]. **Cadernos de saúde pública**, v. 25, n. 8, p. 1653–66, ago. 2009.
- ⁷BNDES. Perspectivas do investimento 2015-2018 e panoramas setoriais. Disponível em: <<http://www.pedbrasil.org.br/>>. Acessado em 15 ago. 2016;
- ⁸ABREU, E. S. DE et al. Alimentação mundial: uma reflexão sobre a história. **Saúde e Sociedade**, v. 10, n. 2, p. 3–14, dez. 2001.

CAPÍTULO 3

Citotoxicidade dos Aditivos Alimentares Sintéticos Utilizados na Dieta Humana

Citotoxicidade dos Aditivos Alimentares Sintéticos Utilizados na Dieta Humana

Flávia Cristina Barbosa Lacerda ^a, Cleber Alberto Schmidt ^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia

Resumo

Para garantir a segurança no uso de aditivos em alimentos o processo de avaliação continuada é imprescindível. O objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade aguda dos aditivos químicos alimentares que, segundo a literatura, oferecem riscos para saúde dos consumidores a curto, médio e/ou longo prazo, no que diz respeito ao seu potencial citotóxico, genotóxico e/ou carcinogênico. A citotoxicidade aguda de 4 edulcorantes, aspartame, sacarina sódica, sucralose e acesulfame de potássio; dois antioxidantes, butilhidroxianisol e butilhidroxitolueno, e dois corantes, azul brilhante e tartrazina, nas concentrações de 0,13 mM a 100 mM foi avaliada através da determinação da viabilidade e proliferação celular por meio do ensaio colorimétrico de redução do sal de tetrazólio (MTT) utilizando células epiteliais de cólon humano (Caco-2), células hepáticas (HepG2) e fibroblastos de tecido conjuntivo (NCTC L-929). Os resultados obtidos mostraram que dentre as três linhagens, a viabilidade média dos fibroblastos foi a mais afetada pela maioria das amostras. Observou-se ainda que o perfil da curva de viabilidade de cada linhagem foi distinto para o mesmo aditivo, impactando no valor calculado da concentração inibitória média (IC₅₀). Os edulcorantes afetaram a viabilidade celular em menor intensidade, já o antioxidante BHA e o corante azul brilhante se destacaram dentre os demais aditivos das suas respectivas classes, apresentando maior potencial citotóxico em todas as linhagens celulares.

Palavras-chaves: Bioensaio. Antioxidantes. Corantes. Edulcorantes. Toxicidade *in vitro*. Segurança alimentar.

* Contatos do autor. Faculdade de Farmácia (FACFAR) – Universidade Federal da Bahia. Rua Barão de Jeremoabo, S/Nº, Ondina, Brasil.
E-mail address: fcb.lacerda@hotmail.com

1. Introdução

Aditivo alimentar é toda substância adicionada intencionalmente aos alimentos, em qualquer etapa da cadeia de produção, incluindo o processamento, armazenamento e estocagem, sem o propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas e/ou sensoriais dos alimentos. São, portanto, recursos tecnológicos que auxiliam na conservação e melhoramento dos produtos alimentares industrializados, agregando sabor, coloração, textura e aroma aos alimentos e bebidas.

Segundo Branen e colaboradores (2002), no mundo inteiro, mais de 2.500 aditivos alimentares naturais ou artificiais diferentes são acrescentados intencionalmente aos alimentos para produzir algum efeito desejado, porém o uso de muitos deles, principalmente corantes e conservantes artificiais, foi proibido em diversos países devido a associação com agravos à saúde (SASAKI et al., 2002), principalmente em crianças (POLÔNIO & PERES, 2009).

Devido aos resultados dos estudos toxicológicos com aditivos, o Japão decidiu retirar do mercado o conservante alimentar AF-2 [2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil) acrilamida] devido ao seu potencial carcinogênico (WHO, 1983), assim como o amarelo de metila, um corante alimentar que foi banido tanto dos Estados Unidos quanto da Europa (WHO, 1975). No entanto, a literatura chama a atenção para o potencial toxicológico de alguns dos aditivos ainda utilizados pela indústria de alimentos no mundo inteiro, principalmente os edulcorantes, a exemplo da sacarina, sucralose e aspartame, adoçantes mais consumidos pela população americana (WHITEHOUSE et al., 2008), apontados como causadores de lesões celulares e alterações genéticas, além da carcinogenicidade multipotente comprovada do último (CHAKRABARTI, 1997; KILLE et al., 2000; SOFFRITTI et al., 2007; BANDYOPADHYAY et al., 2008; ALLEVA et al., 2011; MUKHERJEE; RAHIMAN; POOL, 2014; VAN EYK, 2015).

Os antioxidantes, com destaque para o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e terc-butil-benzoquinona (TBHQ) que, mesmo com potencial genotóxico e citotóxico, são extensivamente utilizados, de forma isolada ou em conjunto, em formulações e alimentos industrializados contendo óleos e gorduras industrializadas (OIKAWA et al., 1998; SASAKI et al., 2002; HAN et al., 2010; BRAEUNING et al., 2012; VANDGHANOONI et al., 2013; ESKANDANI et al., 2014) e os corantes que, além de apresentar citotoxicidade e genotoxicidade, estão associados ao aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças do aparelho circulatório, diabetes e neoplasias, assim como reações adversas agudas ou crônicas, como alergias, alterações no comportamento (como transtorno de déficit de atenção e hiperatividade) e carcinogenicidade a longo prazo (POUL et al., 2009; POLÔNIO & PERES, 2009; MPOUNTOUKAS et al., 2010; VOJDANI; VOJDANI, 2015).

A fim de estabelecer parâmetros de segurança para cada aditivo usado atualmente no mercado, o Comitê de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares (JECFA) utiliza os resultados de ensaios laboratoriais *in vitro* e *in vivo* como uma das etapas para

mensurar o potencial toxicológico dessas substâncias em seres humanos, porém, o parecer de muitas delas ainda permanece não identificado ou inconclusivo, pois são necessários mais estudos nessa área (OMS, 2016).

A toxicidade *in vivo* é um evento complexo, podendo resultar em danos celulares diretos e efeitos fisiológicos sistêmicos, tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, entre outros. Por outro lado, a avaliação da toxicidade *in vitro* é geralmente um evento celular baseado em uma resposta direta da célula, o que confere características como simplicidade e reprodutibilidade aos ensaios *in vitro* (FRESHNEY, 2005). Estes bioensaios representam uma valiosa ferramenta para se estimar os mecanismos pelos quais substâncias podem produzir reações adversas em nível celular. A resposta toxicológica *in vitro* pode ser determinada por meio da avaliação de diferentes parâmetros, como por exemplo, alterações na viabilidade celular ou no metabolismo da célula (LYGRE et al., 1995; FRESHNEY, 2005).

Nesse contexto e diante dos dados toxicológicos atualmente disponíveis na literatura, este estudo utilizou 3 linhagens celulares distintas, do epitélio intestinal (Caco2), hepáticas (HepG2) e fibroblastos (NCTC L929), para avaliar a citotoxicidade *in vitro* de aditivos alimentares que, segundo a literatura, oferecem risco à saúde, a fim de auxiliar na complementação do dossiê avaliativo dessas substâncias, além de alertar às autoridades e a população para os riscos associados ao consumo das mesmas.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras

As amostras foram constituídas por quatro adoçantes sintéticos (aspartame, sucralose, sacarina sódica e acesulfame de potássio), dois antioxidantes sintéticos (butilhidroxianisol - BHA e butilhidroxitolueno - BHT) e dois corantes sintéticos (azul brilhante FCF e tartrazina), todos de grau alimentício, foram cedidos gentilmente por indústrias de alimentos ou adquiridos comercialmente.

2.2. Preparo das amostras

As soluções estoque dos aditivos alimentares foram preparadas em Meio Mínimo Essencial (MEM), acrescidas de 3% (v/v) de glicerol apenas no preparo dos antioxidantes. As soluções estoque e as diluições teste foram preparadas no momento do ensaio para evitar degradação. Para todas as amostras foram testadas 14 concentrações (0,13 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,8 mM, 1mM, 1,5 mM, 2,5 mM, 12,5 mM, 25 mM, 40 mM, 50 mM, 75 mM e 100 mM), em quadruplicata, de forma a avaliar concentrações mais baixas até valores próximos aos índices de Ingestão Diária Aceitável (IDA) de acordo com a literatura recente de cada aditivo (Tabela 1).

Tabela1 – Aditivos alimentares avaliados

Aditivo Alimentar	CAS n°	IDA (mg/kg)	*Concentrações (mg)
Edulcorantes			
Aspartame	22839-47-0	40	6
Sucralose	56038-13-2	15	8
Sacarina sódica	128-44-9	5	4,8
Acesulfame-K	55589-62-3	15	4
Antioxidantes			
BHA	25013-16-5	0,5	3,6
BHT	128-37-0	0,3	4,4
Corantes			
Azul brilhante FCF (trifenilmetano)	3844-45-9	6	16
Tartrazina (azo)	1934-21-0	7,5	10

*As concentrações máximas testadas equivalem a 100 mM do aditivo.

2.3. Cultura e manutenção celular

As linhagens de células epiteliais de adenocarcinoma de cólon humano - Caco-2 (CCIAL063) e fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongos – L-929 (CCIAL 020 – ATCC CCL1) foram adquiridas do acervo do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. A linhagem de carcinoma hepatocelular humano – HepG2 (ATCC HB-8065) foi cedida pelo Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ-BA. A seleção das linhagens de células intestinais e hepáticas se justifica pelo fato destas estarem diretamente associadas aos sistemas fisiológicos humanos e entrarem em contato direto ou indireto com os alimentos; já os fibroblastos servem de contraponto por serem as células mais utilizadas em ensaios de citotoxicidade.

As três linhagens, de crescimento aderente, foram mantidas em MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina 0,1 mg/mL (Sigma). As células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ (Panasonic) e o meio foi substituído a cada 2-3 dias. A suspensão celular foi preparada previamente ao ensaio a partir da monocamada celular confluyente lavada com tampão PBS e removida com tripsina/EDTA. Após centrifugação a 1.000 rpm, 5 min. (Centrifuge 5702R, Eppendorf), o sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas para obter concentração celular com aproximadamente 5x10⁵ células/mL. Transferiu-se 100µL da suspensão para cada cavidade da microplaca que foi incubada (37°C, 5% de CO₂, 24 h) para adesão e crescimento celular.

2.4. Ensaio de redução do sal de tetrazólio – MTT

Utilizou-se a técnica descrita por Mosmann (1983), adaptada para protocolo com microplaca de 96 cavidades (ISO, 2009). Após a fixação das células, o meio foi aspirado e as concentrações de cada amostra, em quadruplicata, foram adicionadas mantendo-se o volume final de 200 µL por cavidade. Para o controle negativo, utilizou-se o diluente da amostra. Como controle positivo utilizou-se partenolídeo (20 mM) em meio MEM. Todas

as diluições das amostras foram incubadas durante 24 h nas mesmas condições iniciais. Ao final da incubação, após remoção da amostra e lavagem com Tampão Fosfato Salino (PBS) estéril, adicionou-se 50µL de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] a 0,5% em MEM. Após um período de incubação adicional de 2 h, o volume de cada cavidade foi aspirado e as células foram lavadas com PBS estéril. Para extração do formazan, adicionou-se 100µL de DMSO e após 2 h de incubação procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

2.5. *Análise dos Resultados*

A viabilidade, expressa em percentual (%), foi calculada em relação ao controle negativo (não tratado) considerado como 100% de viabilidade. O controle positivo foram as células tratadas com partenólídeo, consideradas como 0% de viabilidade.

A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) foi calculada a partir das leituras individuais de 4 experimentos (n=4) plotados em uma curva de regressão não linear de 4 parâmetros – coeficiente de Hill (GraphPadPrism V7) (WEYERMANN et al., 2005).

2.6. *Tratamento Estatístico*

Os dados experimentais foram tratados por meio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA & AZEVEDO, 2016) com a aplicação da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, ambos com nível de significância de 5%, a fim de avaliar comparativamente as médias das respostas celulares para cada aditivo ao longo de todas as concentrações testadas.

3. Resultados

3.1. *Edulcorantes*

O aspartame foi testado frente às três linhagens celulares em concentrações entre 0,13 a 100 mM, com tempo de incubação de 24 h. Até a concentração de 40 mM, todas as células apresentaram resposta similar, com elevada viabilidade e sem variação significativa entre as 3 linhagens ($p \geq 0,05$ – Tukey). A partir de 50 mM, a viabilidade das células NCTC L929 e HepG2 decaiu significativamente ($p < 0,05$) e de forma similar. A viabilidade das células Caco2, mesmo nas concentrações mais altas de aspartame, manteve-se acima de 80% (Figura 1-a).

A viabilidade das três linhagens celulares após 24 h de incubação nas diferentes concentrações de sucralose permaneceu elevada e sem variação significativa ($p \geq 0,05$ – Tukey) até a concentração de 50 mM. A partir deste ponto, observou-se um decréscimo mais acentuado de viabilidade para as células L929 e HepG2, porém, na concentração de 100 mM a resposta foi similar entre as três linhagens, com viabilidade média final de 38%, 26% e 17% (Figura 1-b).

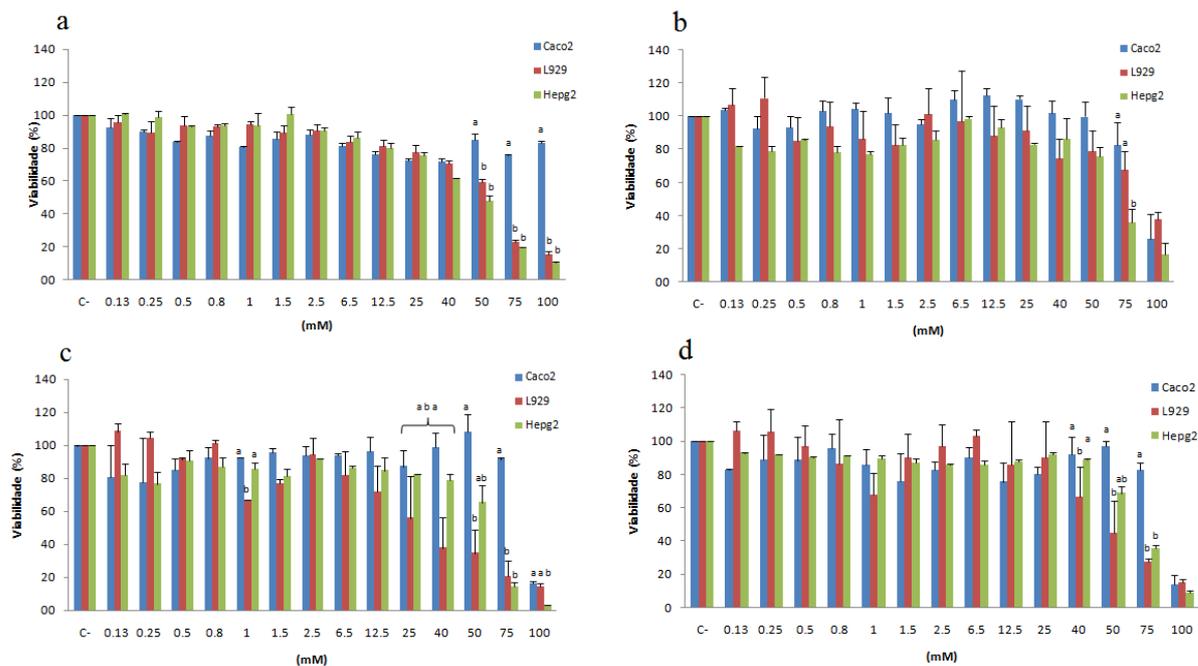


Figura 1 – Viabilidade celular, por MTT, após 24 h de exposição aos aditivos (a) aspartame, (b) sucralose, (c) sacarina sódica e (d) acesulfame de potássio nas concentrações de 0,13 a 100 mM (n=4).

Os resultados da toxicidade da sacarina sódica estão apresentados na Figura 1-c. Observa-se que novamente as células Caco2 mantiveram sua viabilidade elevada até as maiores concentrações avaliadas, decaindo para 16% na concentração de 100 mM. A linhagem HepG2 apresentou perfil de viabilidade similar à Caco2 até a concentração de 50 mM, decaindo a 3% em 100 mM.

A viabilidade das três linhagens após 24 h de contato com o edulcorante acesulfame de potássio apresentou comportamento muito semelhante ao observado para o aspartame e sucralose. A Caco2 manteve sua viabilidade média acima de 80% até a concentração de 75 mM, decaindo para 14% a 100 mM. Este resultado foi similar para as outras células, porém a diminuição da viabilidade se iniciou a partir de 40 e 50 mM para a L929 e HepG2, respectivamente.

Quando os resultados dos quatro edulcorantes são plotados separadamente por célula (Figura 4) é possível evidenciar um perfil de viabilidade distinto entre as três linhagens celulares, porém o perfil apresenta semelhança quando visualizado dentro de cada tipo celular, onde a viabilidade se manteve elevada até as concentrações de 75 mM para a Caco2, de 45 a 50 mM para a HepG2 e de 25 a 40 mM para a L929, refletindo nos valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 2, onde se observa, por exemplo que a média de IC₅₀ da Caco2 foi a mais elevada para todos os edulcorantes.

3.2. Antioxidantes

Frente ao BHA, as linhagens Caco2 e HepG2 apresentaram respostas muito similares ($p \geq 0,05$), sendo que a partir das concentrações de 1,5 e 2,5 mM a viabilidade ficou abaixo

de 70%, atingindo 10 a 16% respectivamente em 25 mM. Os fibroblastos L929 apresentaram resposta citotóxica média mais elevada ao BHA, uma vez que, a partir da concentração de 0,5 mM a viabilidade decaiu para menos de 10% (Figura 2-a). As concentrações de BHA acima de 25 mM causaram interferência no ensaio de MTT, pois foi observado que para todas as células ocorreu formação de um composto intensamente colorido após o período de incubação como MTT, não condizente com a diminuição da viabilidade observada até a concentração de 25 mM, dessa forma, considerou-se apenas os resultados até esta concentração.

Os resultados obtidos com o BHT mostram que, para este aditivo, a linhagem Caco2 teve sua viabilidade afetada em maior grau uma vez que as concentrações acima de 2,5 mM provocaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em comparação às demais células (Figura 2-b). Para este aditivo, a linhagem L929 apresentou viabilidade média mais elevada, ficando abaixo de 70% somente na máxima concentração de BHT avaliada (100 mM).

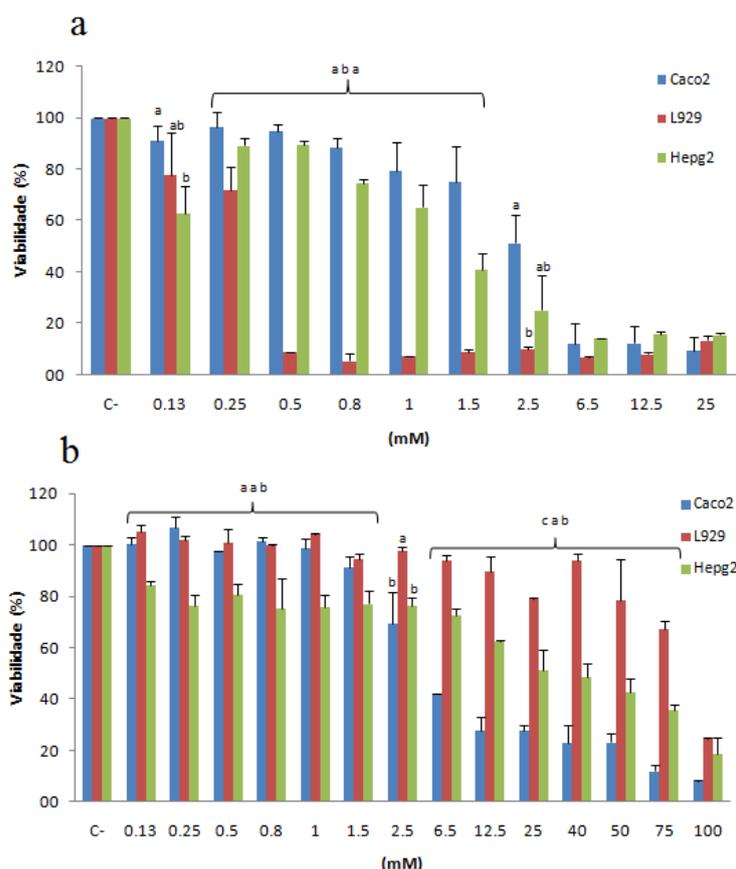


Figura 2 – Viabilidade celular, por MTT, após 24 h de exposição ao (a) BHA e (b) BHT nas concentrações de 0,13 a 100 mM (n=4).

A maior sensibilidade das três linhagens celulares ao BHA fica muito evidente quando os resultados de toxicidade dos dois antioxidantes são observados separadamente dentro de cada grupo celular (Figura 5), sendo que os fibroblastos L929 foram afetados em

maior grau, o que foi determinante para o menor valor de IC₅₀ (11 µg) dentre as três células avaliadas no grupo dos antioxidantes (Tabela 2).

3.3. Corantes

Dentre os corantes, o azul brilhante afetou em maior grau a viabilidade das células, principalmente para a L929 (0,25 mM) e Caco2 (0,5 mM), cujas concentrações promoveram a queda da viabilidade abaixo da faixa de 70%, respectivamente. A linhagem hepática teve sua viabilidade reduzida abaixo deste índice a partir de concentrações 5 vezes superiores às das outras células, entretanto, a partir de 6,5 mM todas apresentaram diminuição intensa da viabilidade (Figura 3-a). As concentrações do azul brilhante superiores a 25 mM deixavam resíduo após a lavagem das células com PBS o que causava a interferência na leitura, portanto foram considerados apenas as respostas até 12,5 mM para este aditivo.

Até a concentração de 50 mM do corante tartrazina todas as células mantiveram-se viáveis, com resultados que não diferiram significativamente ($p \geq 0,05$) entre as linhagens (Figura 3-b). Acima desta concentração a HepG2 apresentou redução acentuada da viabilidade, chegando a 5% em 100 mM, enquanto que L929 e Caco2 permaneceram com valores acima de 50% de viabilidade nesta concentração.

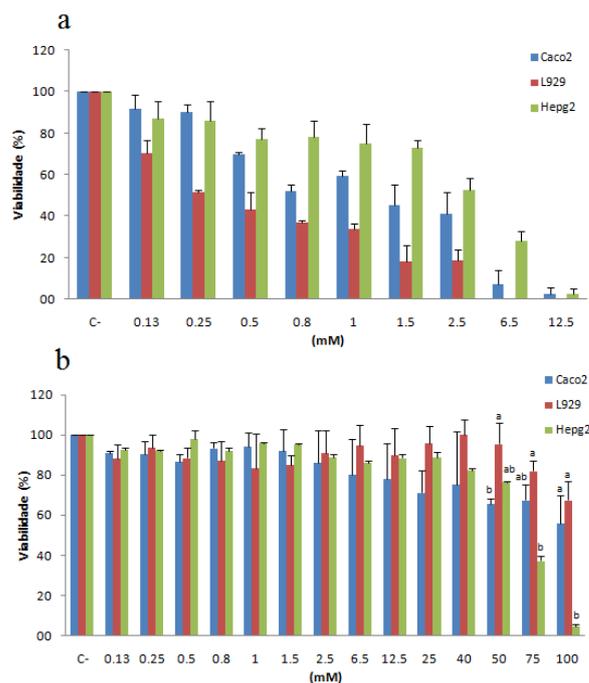


Figura 3 – Viabilidade celular, por MTT, após 24 h de exposição às concentrações de (a)Azul Brilhante e (b) Tartrazina entre 0,13 a 100 mM (n=4).

Quando os dois corantes tiveram seus resultados agrupados por célula observa-se claramente que a tartrazina afetou em menor extensão a viabilidade das três linhagens

(Figura 6), o que resultou em valores de IC₅₀ bem superiores aos calculados para o azul brilhante (Tabela 2).

A Tabela 2 apresenta os resultados de IC₅₀ que é a concentração do composto que causou inibição de 50% da viabilidade celular. Os dados expressos em mM são convertidos para massa para permitir uma análise em relação à IDA de cada aditivo.

Tabela 2 – Valores de IC₅₀ calculados a partir da viabilidade média celular.

Aditivo	IC ₅₀ (mM)[massa (mg)]					
	Caco2		L929		HepG2	
Acessulfame	>100		45,3	[1,8]	81,9	[3,3]
Sacarinasódica	86,8	[4,2]	31,6	[1,5]	61,7	[2,9]
Sucralose	>100		>100		72,9	[5,8]
Aspartame	>100		63,9	[3,7]	64,0	[3,7]
BHA	2,5	[0,09]	0,3	[0,011]	1,3	[0,047]
BHT	3,7	[0,16]	>100		78,9	[3,5]
Tartrazina	>100		>100		95,7	[10,2]
Azul brilhante	1,3	[0,21]	0,64	[0,1]	3,8	[0,6]

(>100) valor calculado ficou acima da máxima concentração avaliada de 100 mM

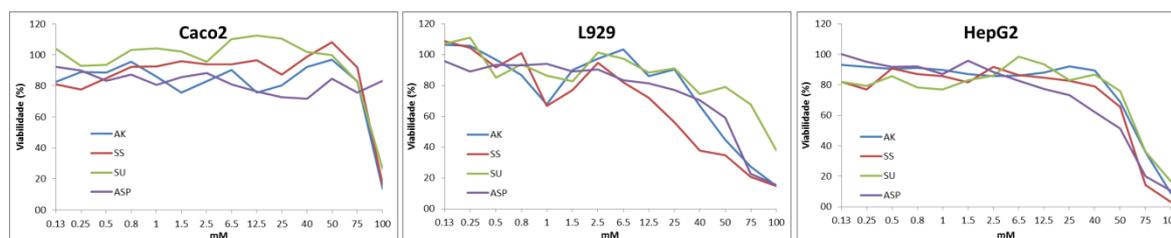


Figura 4 – Perfil comparativo de viabilidade das três linhagens celulares após 24 h de exposição aos aditivos do grupo dos edulcorantes nas concentrações de 0,13 a 100 mM.

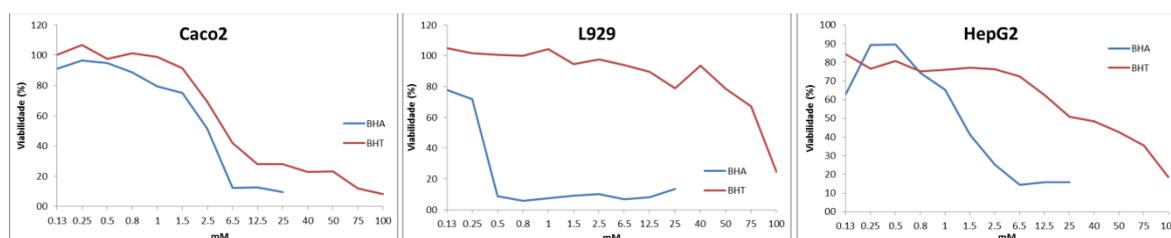


Figura 5 – Perfil comparativo de viabilidade das três linhagens celulares após 24 h de exposição aos aditivos do grupo dos antioxidantes nas concentrações de 0,13 a 100 mM.

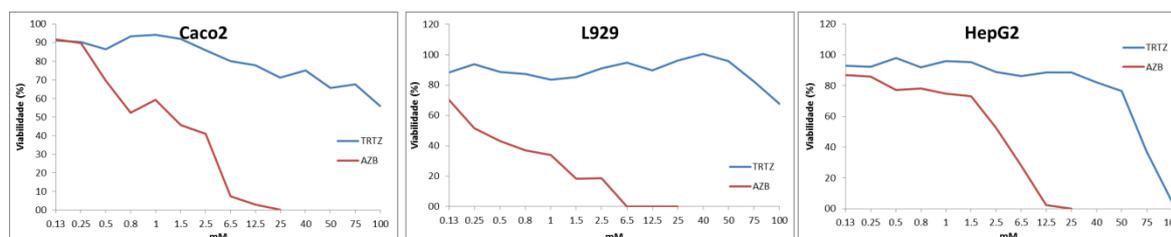


Figura 6 – Perfil comparativo de viabilidade das três linhagens celulares após 24 h de exposição aos aditivos do grupo dos corantes nas concentrações de 0,13 a 100 mM.

4. Discussão

A ingestão real de um aditivo alimentar sofre modificações à medida que novos produtos contendo estes compostos são lançados no mercado, novas aplicações tecnológicas são descobertas, bem como na proporção que os hábitos alimentares da população sofrem modificações. Por isso, o Codex Alimentarius recomenda a avaliação periódica dos estudos de ingestão potencial dos aditivos alimentares, com base nos dados nacionais de consumo dos alimentos e na sua utilização tecnológica, a fim de confrontar os valores estimados de consumo de uma determinada população com a Ingestão Diária Aceitável (IDA) vigente (BANNWART, 2000). Essa premissa também deve ser seguida para pesquisas mais específicas, não menos importantes, como as avaliações genotóxicas, citotóxicas e possíveis alterações sistêmicas sob o efeito dos aditivos. Sendo assim e, de posse dos dossiês dessas substâncias, cada país deve adotar uma IDA condizente com a real relação da população e um dado aditivo. Um exemplo claro é o aspartame, que possui IDA de 50 mg/kg/dia nos EUA para adultos e de 40 mg/kg/dia na União Européia para adultos ou crianças (ALLEVA et al., 2011). Essa diferença na rigorosidade do controle do aspartame ou de qualquer outro aditivo está pautada no histórico comportamental dessas substâncias em diferentes tipos de ensaios.

2.1. *Edulcorantes*

Dentre os adoçantes artificiais objetos desta pesquisa, a sacarina é o mais antigo no mercado. Apesar de ser 300 vezes mais doce do que a sacarose, tem um sabor amargo e, por isso, era misturado ao ciclamato para melhorar a palatabilidade. Foi descoberto por Constantine Fahlberg em Johns Hopkins em 1879 enquanto trabalhava em derivados de alcatrão de carvão. O seu uso era recomendado apenas para pessoas diabéticas, porém, devido à escassez de açúcar e ao apelo estético que favorecia uma figura esguia em meados da segunda guerra mundial, a sacarina passou a ser recomendada para redução do consumo calórico, em detrimento da sacarose. Diante de estudos que alertavam sobre a segurança no consumo da sacarina, o FDA anunciou a intenção em proibi-la, porém, por pressão social, o aditivo continuou sendo permitido, mediante rotulagem de advertência até o ano 2000 (YANG, 2010).

O posicionamento da comunidade científica quanto à toxicidade da sacarina continua dúvida ainda hoje. Um expressivo potencial citotóxico em lipoproteínas humanas foi identificado por Kim e colaboradores (2015), associado a uma perda da atividade antioxidante da HDL, com influência na aceleração do envelhecimento e aterosclerose, via produção de espécies reativas de oxigênio, assim como Bandyopadhy e colaboradores (2008) atestaram o potencial genotóxico do aditivo, mesmo não sendo mutagênico. Por outro lado, Jeffrey Willians (2000) sustentaram a teoria de que a sacarina não é cancerígena, comprovando a não hepatotoxicidade do aditivo no nível de DNA em ratos albinos. Rahiman e Pool (2014) também não encontraram efeito citotóxico da sacarina quando testado em leucócitos humanos, observando apenas um efeito supressor na secreção da interleucina-6 (IL-6).

Quando submetido ao teste de MTT, a sacarina promoveu diminuição da viabilidade dos fibroblastos a partir de concentrações correspondentes a 25 mM (1,2 mg), sendo que na concentração de 100 mM (4,8 mg), valor próximo a IDA da sacarina (5 mg/kg/dia), todas as células demonstraram perda significativa da viabilidade, o que corrobora com os resultados da literatura que indicam pela toxicidade da sacarina. A diferença no padrão de resposta dos diferentes tipos celulares, determinante para os valores de IC₅₀ calculados para esta substância, reforça a importância da avaliação do comportamento dos aditivos em tipos celulares ainda não estudados.

Em 1965, James Schlatter em Searle descobriu o aspartame, liberado pelo FDA após extensivos testes de segurança. Sua estrutura consiste em dois aminoácidos, fenilalanina e aspartato, ligados a uma molécula de metanol que, diferente dos demais adoçantes artificiais excretados inalterados, pode ser metabolizado e, portanto é proibido para fenilcetonúricos. O aspartame é cerca de 200 vezes mais doce que a sacarose e sua aprovação pelo FDA se deu primeiro para uso em alimentos secos em 1981, em seguida, como um edulcorante geral em 1996 (YANG, 2010).

Para o aspartame, apesar de divergências, os estudos apresentaram uma tendência mais concordante e a discussão perpassou também sobre o efeito do aditivo sob variadas matrizes e em diversas concentrações. Alleva e colaboradores (2011) comprovaram a capacidade do aspartame em induzir a angiogênese em uma matriz de fibroblastos na presença de células sanguíneas, quando testado em baixas concentrações, através da produção de pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio, IL-6 e outras citocinas, que funcionaram como moléculas mediadoras de crescimento, diferenciação e indutoras da expressão gênica, ao passo que as mesmas moléculas, quando encontradas em maiores concentrações, induziram morte celular. Sendo assim, o experimento demonstrou que a fronteira entre toxicidade e benefícios da sua utilização, depende da concentração e do tipo celular ao qual o aditivo é testado, o que justifica a divergência quanto à segurança do aspartame na literatura.

Kim e colaboradores (2015) reforçam o efeito antioxidante do aspartame quando em pequenas concentrações, neste caso em contato com lipoproteínas, e um efeito tóxico em altas concentrações, reflexo de severa degradação proteolítica do HDL3 (100 mM) *in vitro*. Alsuhaibani (2010) confirma em seu trabalho a segurança do uso do aspartame em baixas concentrações, mas alerta para uma relação dose dependente direta na indução de aberrações cromossômicas, mas não na troca de cromátides irmãs em teste de genotoxicidade, quando testado em concentrações mais elevadas.

Outros trabalhos, como o de Soffritti e colaboradores (2007) mostram o contrário. Os ensaios de toxicidade confirmam o caráter carcinogênico multipotente do aspartame, tanto para ratos machos quanto para fêmeas, nos níveis próximos a IDA para humanos. Ficou demonstrado também que, quando a exposição ao aspartame começa durante a vida fetal, seus efeitos carcinogênicos são aumentados.

Para além da toxicidade, Palmnäs e colaboradores (2014) encontraram uma associação negativa ao consumo de baixas concentrações do aspartame. Em um modelo animal, os autores evidenciaram um aumento da glicemia em jejum tanto nos ratos magros quanto em obesos, quando tratados com baixas doses de aspartame, relacionado à redução

na sensibilidade periférica à insulina provocada pelo aditivo, o que pode levar ao desenvolvimento da Diabetes tipo 2, como também alterações metabólicas séricas e desequilíbrio da microbiota intestinal. Nessa mesma linha, Yang (2010), em revisão, expõe trabalhos que fazem associação do consumo regular do aspartame e outros adoçantes artificiais com o aumento de peso, tanto em adultos quanto em crianças.

Outros autores, como Mukhopadhyay, Mukherjee e Chakrabarti (2000), estudaram edulcorantes em associação e comprovaram estatisticamente que o consumo combinado de aspartame e acesulfame de potássio não foi genotóxico no nível de células de medula óssea para a via de exposição (oral), nos níveis de dose utilizados e nas espécies testadas, suscitando novamente a importância de se estudar os aditivos, separados ou em conjunto, em diferentes matrizes, pois os efeitos podem ser diferentes.

Considerando a elevada IDA brasileira e da União Européia para o aspartame (40 mg/kg/dia) não foi possível avaliar concentrações tão altas no ensaio de MTT, entretanto observou-se que este composto apresentou toxicidade considerável nas células HepG2 e L929 a partir da concentração de 50 mM (3 mg), resultando em valores de IC₅₀ de 3,7 mg para as duas linhagens. No caso das células Caco2 a viabilidade não foi afetada dentro da faixa de concentrações avaliadas para o aspartame (7,8 µg a 6 mg), entretanto destaca-se que a dose máxima avaliada foi aproximadamente 7 vezes inferior a IDA do composto. Esses resultados associados aos dados da literatura sobre a toxicidade do aspartame sinalizam para as autoridades nacionais e internacionais sobre a necessidade de revisão quanto aos parâmetros de ingestão diária estabelecidos, os quais são atualmente considerados seguros para a população e, alerta aos usuários para o consumo continuado e excessivo desse aditivo.

A indústria química alemã Hoechst descobriu o acesulfame de potássio em 1967, adoçante artificial semelhante à sacarina e ao ciclamato na estrutura e no sabor, porém o FDA só aprovou seu uso em alimentos secos em 1988 e como um edulcorante geral em 2003 (YANG, 2010). Em relação aos demais edulcorantes artificiais, o acesulfame de potássio tem a vantagem de não perder o poder edulcorante após aquecimento ou congelamento e, desde a sua aprovação em 2003 como edulcorante de uso geral, passou a ser extensivamente usado em muitos produtos, junto com a sucralose ou o aspartame (KARSTADT, 2010).

Dentre outras questões acerca da segurança do consumo do acesulfame, Karstadt (2006) alerta para a presença de misturas de aditivos (ex. acesulfame e sucralose) em alimentos e a falta de testes consistentes avaliando se há efeito aditivo de resposta, aditivo de concentração, sinérgico ou irrelevante no consumo destas misturas em termos de carcinogenicidade e/ou toxicidade. Karstadt (2010) chama a atenção ainda sobre a falta de bioensaios toxicológicos consistentes do acesulfame de potássio e considera a sua liberação pelo FDA precipitada, baseada em testes inadequados. O autor ainda denuncia a certificação do aditivo como não carcinogênico pelo FDA, mesmo após testes *in vivo* que comprovaram a relação do aditivo com o aparecimento de câncer em ratos. Além disso, os estudos clínicos e pré-clínicos feitos para validar a segurança deste edulcorante não estão disponíveis para acesso da comunidade científica.

A importância de se observar as mudanças nos padrões alimentares foi estudada por Husøy e colaboradores (2008) na Noruega. Os autores alertam sobre o preocupante consumo de acesulfame acima da IDA por crianças norueguesas, além do alto consumo de ácido benzóico, proveniente de bebidas dietéticas. Essa mudança de hábito alimentar foi motivada pelos altos índices de obesidade, contudo, em associação com o aspartame (MUKHOPADHYAY, MUKHERJEE & CHAKRABARTI, 2000), e em estudos de carcinogêneses (JEFFREY & WILLIAMS, 2000), o acesulfame de potássio não apresentou efeitos tóxicos. Apenas Kim e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento com altas doses de acesulfame de potássio gera perda de capacidade antioxidante das lipoproteínas isoladas de plasma humano, juntamente com efeitos aterogênicos elevados (formação de placas de ateroma).

No ensaio de MTT, a mais alta concentração de acesulfame avaliada (4 mg) foi 3,75 vezes inferior a IDA Brasileira (15 mg/kg/dia) e os resultados foram similares aos observados para o aspartame, diferindo apenas pelo fato de que, no caso do acesulfame, a Caco2 apresentou perda de viabilidade na maior concentração avaliada, sinalizando que este aditivo pode apresentar risco quando consumido em excesso, uma vez que o experimento demonstrou que os 3 tipos celulares tiveram sua viabilidade afetada em maior ou menor grau dentro da faixa de 5µg até 4 mg.

O adoçante artificial mais recentemente descoberto foi a sucralose, fruto de experimentos com a sacarose em 1979. Através da substituição do cloro por três hidroxilas. Shashikant Phadnis descobriu a sucralose acidentalmente, um adoçante 600 vezes mais doce que a sacarose, aprovado em 1999 pelo FDA para uso geral em alimentos e bebidas (YANG, 2010). A sucralose é muito estável a altas temperaturas e em meio ácido, não calórica, insípida e não é hidrolisada mesmo durante a digestão ou metabolismo em virtude da extrema estabilidade de suas ligações carbono-cloro, além de não interferir no metabolismo de carboidratos, absorção de glicose e secreção de insulina. É excretada de forma inalterada, majoritariamente pela via fecal (85%) (RODERO et al., 2009).

A literatura relata que dentre os inúmeros estudos realizados com modelos animais, de forma geral, não foram observados resultados toxicológicos significativos a nível hepático (JEFFREY & WILLIAMS, 2000) ou teratogênico, apesar de alguns animais adultos terem exibido marcadas perturbações gastrointestinais (KILLE et al., 2000), redução no ganho de peso atribuída à diminuição no consumo de alimentos devido à palatabilidade reduzida da dieta acrescida de sucralose (MANN et al., 2000) e algumas alterações histopatológicas, esplênicas e tímicas, quando em maiores concentrações (GOLDSMITH, 2000). Em testes *in vitro*, também não foi observada qualquer citotoxicidade provocada pela sucralose em leucócitos humanos, porém, sob condições estimulantes, além de a sucralose suprimir a secreção de IL-6, relatada também para o aspartame e sacarina, houve a supressão de IL-10, o que pode estar relacionado à incapacidade de montar uma resposta humoral eficaz quando posto com uma ameaça exógena (RAHIMAN & POOL, 2014). As evidências literárias são reforçadas na revisão de Rodero, Rodero e Azoubel (2009), apontando para a não associação da sucralose a carcinogenicidade, porém relacionando o aditivo a alterações renais, com menor excreção urinária, perda de peso corporal e redução do número de linfócitos no sangue. Além destes

dados, até o momento não foram encontrados dados mais específicos de citotoxicidade basal para este composto.

A IDA recomendada para a sucralose é de 15 mg/kg/dia, entretanto no ensaio de MTT, foram avaliadas concentrações entre 10 µg até, no máximo, 8 mg. De fato, a diminuição significativa da viabilidade em presença da sucralose foi observada somente nas concentrações mais altas (6 a 8 mg), o que conferiu à sucralose os maiores valores médios de IC₅₀ dentro do grupo dos edulcorantes, porém ainda assim, deve-se destacar que a maior concentração testada perfaz pouco mais de 50% da IDA da sucralose.

Observou-se que há uma similaridade no perfil de viabilidade de cada linhagem celular frente aos quatro edulcorantes (Figura 4), isso demonstra que a resposta citotóxica depende, entre outros fatores, do tipo celular empregado no estudo. Tal observação também é descrita por Chowdhury e colaboradores (2013) que utilizaram quatro linhagens celulares e seis diferentes testes para o estudo da toxicidade celular de nanoestruturas de grafeno, sendo que as linhagens celulares diferiram significativamente em sua resposta para o mesmo composto analisado.

Da mesma forma, Weyermann e colaboradores (2004) encontraram valores de IC₅₀ muito diferentes para quatro compostos que têm distintos mecanismos de citotoxicidade quando estes foram testados sobre o mesmo sistema celular (células de camundongo L-tk ATCC CC11.3) utilizando quatro distintos modelos *in vitro* (LDH, MTT, vermelho neutro e ATP) para avaliação da toxicidade. Os autores concluíram que a viabilidade celular é dependente da amostra e do mecanismo pelo qual ela induz o dano celular, assim como pela metodologia escolhida para avaliar a citotoxicidade (leitura do ponto final).

2.2. Antioxidantes

O butilhidroxianisol (BHA) e outros fenólicos sintéticos passaram a ser usados em alimentos, não só como antioxidantes lipídicos, mas também numa perspectiva de moduladores de doenças humanas relacionadas ao envelhecimento, mais precisamente câncer, doenças cardiovasculares, catarata, supressão imunológica, entre outras doenças degenerativas, por reduzirem seletivamente os radicais livres. Porém, alguns estudiosos evidenciaram que o BHA estava relacionado ao desenvolvimento de lesões no esôfago e no fígado de animais e, a depender da dose e do tempo de exposição, estas poderiam evoluir para um carcinoma. Por considerar a falta de opção para substituir este aditivo disponível no mercado e a observação da possibilidade de formação de tumores exclusivamente em roedores sem a ocorrência em outros mamíferos, assumiu-se que haveria uma margem de segurança para o uso do BHA em alimentos voltados para humanos e, por isso, o antioxidante continua sendo utilizado pela indústria de alimentos (IVERSON, 1995).

Willians e colaboradores (1999) afastaram a hipótese do seu potencial carcinogênico está associado a danos diretos no DNA. Os estudos apontaram que o mecanismo carcinogênico do BHA está ligado a alterações nas junções gap de células da porção anterior do estômago de roedores, acarretando o surgimento de papilomas, hiperplasia e carcinoma exclusivo para esse tecido, explicação coerente, tendo em vista que as junções gap ou comunicantes atuam também como supressores de tumor. Outro fato importante é

que tais alterações causadas pelo BHA foram reversíveis quando a administração do aditivo foi suspensa. Quanto à citotoxicidade, embora tenha sido sugerido que sua ação oxidativa em altas concentrações fosse a causa chave, não foram encontradas evidências que comprovassem esta hipótese. Alguns estudiosos também estudaram a ação do BHA como anticarcinogênico e verificaram que doses baixas de BHA inibem a carcinogênese, quando administradas antes e durante as exposições a carcinógenos reativos ao DNA, sendo a atividade de captura de radicais livres o mecanismo de proteção.

Os estudos com os antioxidantes fenólicos, em geral, evidenciam a capacidade paradoxal destes compostos em mudar sua função antioxidante para pró-oxidante. Isso ocorre quando as vias de proteção metabólica estão saturadas e a concentração e o ambiente lhes permitem oxidar materiais que têm baixos potenciais eletroquímicos. Pesquisas indicam que o BHA pode sofrer transformações metabólicas que desencadeiam no aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e, conseqüentemente no estresse oxidativo seguido de apoptose ou necrose, o que justificaria o aparecimento de lesões esofágicas e alterações histopatológicas no fígado quando da administração de doses elevadas de BHA em roedores. É sugerido que a produção de tumores pelo BHA resulta de um mecanismo secundário dependente da saturação de uma via metabólica por níveis excessivos de BHA. Por fim, o autor ainda alerta para a multiplicidade de vias metabólicas com as quais o BHA pode vir a ter atividade, produzindo efeitos benéficos ou indesejáveis (IVERSON, 1995).

Outros trabalhos apontam para uma interação negativa do BHA em vias de expressão hormonal. Li e colaboradores (2016a) mostraram que o BHA pode ser um inibidor seletivo da isoenzima HSD11B2, reguladora local do nível de glicocorticóide ativo, o que pode acarretar em uma ação glicocorticóide excessiva em tecidos locais, como rins e placenta. Li e colaboradores (2016b) ainda avaliaram os efeitos do BHA sobre a esteroidogênese em células de Leydig imaturas de ratos e concluíram que o aditivo inibiu a produção de andrógenos via expressão gênica.

Na avaliação do BHA como potencial genotóxico, Iverson (1995) e Vandghannoni e colaboradores (2013) constatam que há uma dependência do consumo contínuo do aditivo e da administração de altas doses para que o dano ocorra. Porém, o primeiro afirma que a via de atuação do aditivo estaria relacionada provavelmente com o desacoplamento do sistema enzimático citocromo-P450 e a subsequente produção de quantidades excessivas de peróxido de hidrogênio, enquanto que o segundo justifica a genotoxicidade do BHA via fragmentação do DNA, da cromatina e indução de apoptose celular.

Por ser a IDA do BHA relativamente baixa (0,5 mg/kg/dia) foi possível avaliar o efeito de concentrações mais altas no ensaio do MTT. Entretanto, na concentração de 6,5 mM (0,23 mg) já se observou uma diminuição expressiva da viabilidade das três linhagens celulares, indicando que o BHA teve efeito citotóxico expressivo, o que resultou em valores de IC₅₀ de 90 µg, 11 µg e 65 µg para a Caco2, L929 e a HepG2, respectivamente, corroborando com os indícios científicos de que este composto, em concentrações elevadas, apresenta efeitos deletérios sobre os sistemas celulares .

A revisão de Iverson (1995) podem explicar o comportamento nocivo do BHA para as células HepG2, uma vez que se trata de células de hepáticas e levando em consideração

o tropismo do BHA para este tecido e para as células da porção anterior do estômago de roedores, em termos de lesões. Fato curioso observado foi a sensibilidade da linhagem L929 ao BHA, com IC₅₀ de 11 µg, sendo um tecido até então não associado a lesões de forma direta. Por outro lado, sendo a L929 uma linhagem celular de fibroblastos do tecido subcutâneo conectivo, os resultados encontrados podem vir a acrescentar no entendimento fisiológico de lesões em outros órgãos, uma vez que os fibroblastos são células envolvidas no processo de recuperação de lesões e regeneradoras da matriz extracelular de vários tecidos e, sendo também afetados pelo BHA, podem dificultar/atrasar ainda mais seu processo de recuperação.

Assim como o BHA, o butilhidroxitolueno (BHT) também é usado para preservar e estabilizar o frescor, o valor nutritivo, o sabor e a cor dos alimentos. Em 1986, a Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (IARC) avaliou o BHA e encontrou evidências suficientes de carcinogenicidade em animais, já para o BHT, as evidências de carcinogenicidade foram limitadas. Até então, não havia dados para avaliar tal relação em humanos. De fato, o BHT não foi considerado genotóxico nem carcinogênico após inúmeros ensaios com diferentes matrizes (bactérias, vegetais, tecidos e roedores). Assim como o BHA, o BHT também apresentou atividade anticarcinogênica em pequenas doses quando administradas antes e durante as exposições a carcinógenos reativos ao DNA (WILLIAMS et al., 1999).

Grillo e Dulout (1997) demonstraram a capacidade do BHT em reduzir significativamente as aberrações cromossômicas causados pela bleomicina, conhecida danosa ao DNA, através da prevenção ou redução dos radicais livres produzidos por esta droga. Sendo assim, fica evidente que o comportamento do BHT como agente modulador na mutagênese induzida quimicamente e na carcinogênese depende da via e do tempo de administração, do tecido alvo, da espécie e do tipo de carcinógeno administrado, da dose e frequência da exposição, podendo ser um potente promotor ou inibidor do desenvolvimento de tumores em animais de laboratório.

Por outro lado, alguns autores associam o BHT à toxicidade, porém em condições especiais, como Oikawa e colaboradores (1998) que relataram genotoxicidade dos produtos do metabolismo do BHT em presença de cobre.

No ensaio de MTT, o baixo valor de IDA do BHT (0,3 mg/kg/dia) permitiu testá-lo em uma faixa de concentração de 5,7 µg até 4,4 mg, portanto bem superior à IDA do BHT e, diferentemente do observado para demais compostos, foi a Caco2 que se mostrou mais susceptível, tendo sua viabilidade reduzida a partir da concentração de 6,5 mM (0,29 mg). Entretanto, de uma forma geral, os valores de IC₅₀ calculados foram em média, bem superiores aos do BHA, condizente com a maior segurança do BHT relatada pela literatura. Nota-se assim que o valor da IDA dos 2 antioxidantes acaba por ser contraditório, uma vez que este é superior para o BHA, composto este que mostrou maior toxicidade aguda e relatos científicos mais contundentes quanto à sua segurança.

2.3. Corantes

O consumo de corantes artificiais vem aumentando ao longo dos anos, subindo de 12 mg/*per capita*/dia em 1950 para 68 mg/*per capita*/dia em 2012 (STEVENS et al., 2013), sendo as crianças os maiores consumidores desse grupo de aditivos (MASONE & CHANFORAN, 2015). O FDA define aditivo de cor como qualquer corante, pigmento ou outra substância que possa conferir cor a um alimento, fármaco ou cosmético ou ao corpo humano, com a finalidade de compensar a perda de cor devido a fatores externos interferentes, reforçar as cores para tornar o produto mais atraente, fornecer cor para produtos incolores ou como fator de diferenciação, especialmente para medicamentos (AMCHOVA, KOTOLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015). São em sua maioria oriundos do petróleo e apontam para uma relação entre seu uso indiscriminado e muitos transtornos imunológicos e alérgicos, além de problemas comportamentais em crianças, tais como agressão, transtorno de déficit de atenção e de déficit de atenção / hiperatividade (VOJDANI & VOJDANI, 2015).

O azul brilhante FCF é um corante trifenilmetano que confere a cor azul aos alimentos, solúvel em água, quase que completamente excretado de forma inalterada nas fezes, com percentual metabolizável insignificante. O azul brilhante foi testado quanto a toxicidade pelo JECFA, em 1970, e também pelo Comitê Científico de Alimentação Humana (SCF) em 1975, que estabeleceram um IDA de 12,5 mg/kg/dia. Em seguida, os resultados foram revistos, resultando na redução da IDA para 10 mg/kg/dia e, finalmente, para 6 mg/kg/dia, referente ao consumo real registrado na população Européia. Todavia, de acordo com avaliações mais recentes feitas pela EFSA, o consumo de doses reduzidas ainda pode causar reações de hipersensibilidade em indivíduos susceptíveis (AMCHOVA, KOTOLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015).

Ademais, o azul brilhante apresentou efeitos genotóxicos e citotóxicos significativos em linfócitos humanos, além de uma diminuição dose dependente nos valores das frequências de índices mitóticos e de micronúcleos (KUS E EROGLU, 2015).

A leitura do ensaio de MTT para doses acima de 25 mM de azul brilhante foi inviável devido ao forte poder agregativo do aditivo às células, entretanto, concentrações bem inferiores à IDA atual (6 mg/kg/dia) já causaram uma perda significativa da viabilidade para as 3 linhagens celulares, cujo IC₅₀ ficou entre 100 µg a 600 µg. Esses achados servem de alerta para as autoridades quanto à segurança no consumo do azul brilhante, principalmente para crianças e pessoas com hipersensibilidade e alergias, ainda mais se considerarmos que alguns dos mediadores dos processos alérgicos também estão relacionados aos processos inflamatórios, de proliferação celular e, conseqüentemente, tumorais.

A tartrazina é um corante *azo* que confere a cor amarela aos alimentos, solúvel em água, quase que completamente excretado de forma inalterada pela urina, mas que pode ser metabolizado pela microflora intestinal. A toxicidade da tartrazina foi avaliada extensivamente pelo JECFA em 1966 e em seguida pelo SCF em 1975 e 1984. Ambas as avaliações atestaram a segurança do consumo da tartrazina até 7,5 mg/kg/dia (AMCHOVA, KOTOLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015), porém, a sua última

avaliação em 2009 feita pela EFSA, sugere que o corante é capaz de influenciar diretamente na migração do DNA em ensaio de cometa (SASAKI et al., 2002). Este resultado sugere que os danos temporários no DNA observados nos estudos de Sasaki e colaboradores (2002) são incapazes de serem fixados em lesões genotóxicas estáveis e podem ser parcialmente explicados pela citotoxicidade local do corante (POUL et al., 2009).

Para além dos estudos que associam a tartrazina a alterações comportamentais em crianças (POLÔNIO & PERES, 2009), a literatura recente tem estudado o potencial de ligação da tartrazina a proteínas e células humanas e suas consequências funcionais. Ficou confirmada sua capacidade em se ligar à albumina de soro humano e bovino e formar um complexo com estas proteínas, limitando potencialmente a sua função fisiológica (BASU & KUMAR, 2015) podendo controlar a concentração desta proteína no organismo, ou até mesmo comprometer sua importante função no transporte de variadas moléculas (MASONE & CHANFORAN, 2015).

Ficou demonstrado em outro estudo que a ligação da tartrazina à hemoglobina produziu fortes alterações de configuração da proteína após complexação, acarretando em perda significativa na sua estabilidade helicoidal e, conseqüentemente, perda de eficiência biológica, o que poderia acarretar em riscos para a saúde (BASU & KUMAR, 2016).

Os resultados obtidos no ensaio de MTT são compatíveis com os relatos da literatura de que este corante é mais seguro que o azul brilhante, uma vez que as células Caco2 e L929 praticamente mantiveram sua viabilidade ao longo das concentrações de tartrazina avaliadas, apresentando uma diminuição da sua viabilidade na concentração de 100 mM (10 mg), com a HepG2 um pouco mais sensível, mas mesmo assim, sua viabilidade reduziu mais intensamente a partir da concentração de 75 mM, que corresponde exatamente ao IDA Brasileira (7,5 mg/kg/dia) para a tartrazina. Este resultado pode estar associado ao fato de este corante apresentar baixa taxa de absorção pelo organismo, uma vez que apenas 5% da tartrazina consumida é absorvida, o que torna os efeitos deletérios do aditivo, em termos fisiológicos reais, bastante improváveis. Tais resultados reforçam o atestado de segurança das autoridades nacionais e internacionais acerca do consumo da tartrazina que, fisiologicamente, continua sendo seguro graças a seu baixo percentual de absorção (AMCHOVA, KOTLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015).

Para a avaliação da citotoxicidade aguda, é preciso ter em mente que existem muitas vias indutoras do efeito tóxico na célula, e conseqüentemente várias formas de detecção, as quais podem empregar desde corantes supravitalis, métodos que avaliam a integridade da membrana e o funcionamento enzimático ou técnicas que avaliam a indução das vias apoptóticas celulares. Para além destes fatores, existem ainda os diferentes mecanismos de toxicidade celular, os quais também podem diferir de acordo com o tempo de exposição e/ou frequência (SCHERLISS, 2011).

Entre os mecanismos de toxicidade aguda, o dano direto à membrana celular e as alterações no funcionamento celular devido ao mau funcionamento ou desorganização enzimática são os mais pronunciados e por isso são geralmente os de primeira escolha em estudos deste tipo. Nesse contexto, o ensaio de MTT é um dos modelos analíticos *in vitro* muito utilizado para avaliar a viabilidade e proliferação celular (WEYERMANN et al.,

2004; SCHERLIESS, 2011). Este ensaio tem por base avaliar a atividade metabólica de células que se mantiveram viáveis após o período de incubação com a amostra, e tem como alvo as funções catalíticas das desidrogenases mitocondriais que podem ser facilmente afetadas por efeitos tóxicos dos compostos sob estudo, conferindo boa sensibilidade a este modelo analítico, que se fundamenta na reação enzimática de redução do sal de tetrazólio (MTT) à formazan, composto resultante de coloração azul (MOSMANN, 1983).

5. Conclusão

Os fibroblastos L929 foram as células mais frequentemente afetadas pelos aditivos avaliados neste estudo e a linhagem Caco2 foi a que teve sua viabilidade média menos alterada. De fato, os fibroblastos são as células de primeira escolha em muitos testes de citotoxicidade aguda em função da sua sensibilidade e fácil manutenção, entretanto podem muitas vezes não mimetizar as condições ideais para as quais se deseja avaliar determinados compostos. Na maioria das amostras analisadas, os perfis das curvas de viabilidade de cada linhagem foram distintos para os mesmos aditivos e respectivas concentrações, tal fato pode impactar no cálculo da IC_{50} . Essa observação reforça a necessidade de se escolher adequadamente o ensaio, considerando qual o efeito esperado e o mecanismo pelo qual a morte celular pode acontecer, além de considerar também outros fatores que podem interferir no modelo analítico.

Mesmo utilizando um único modelo de ensaio, MTT, os resultados encontrados para as três linhagens celulares estão em concordância com os demais indícios científicos que apontam para os problemas deletérios que os aditivos alimentares sintéticos podem causar sobre os diferentes sistemas celulares, corroborando assim com as pesquisas que indicam pela revisão dos limites de ingestão diária de muitos compostos alimentares, no sentido de aumentar sua margem de segurança, principalmente se considerarmos que a população está cada vez mais exposta a ingestão combinada de vários aditivos, ao aumento no consumo de alimentos processados, aliado a maior expectativa de vida e aos demais riscos associados ao desenvolvimento de enfermidades, principalmente aqueles relacionados aos processos alérgicos, inflamatórios e tumorais.

Quanto à extrapolação destes resultados para o organismo humano, é necessário se ter em mente que os bioensaios deste tipo possuem um longo histórico no *screening* da toxicidade ou outras respostas fisiológicas e, mesmo apresentando vantagens como fácil manuseio, baixo custo relativo, elevada sensibilidade, capacidade de gerar dados qualitativos e quantitativos de forma rápida, redução do número de animais usados em estudos laboratoriais e a observação direta do efeito sobre as células, estes ensaios devem ser considerados como técnicas preliminares na predição da toxicidade, sendo, portanto, fundamental que a interpretação dos dados gerados seja complementada com outros testes, principalmente estudos *in vivo*, para que se possa correlacionar os resultados obtidos e o risco real que os mesmos representam à saúde humana.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESB, a Universidade Federal da Bahia e as empresas parceiras pelo fornecimento das amostras.

Referências

ALLEVA, R., BORGHI, B., SANTARELLI, L., STRAFELLA, E., CARBONARI, D., BRACCI, M., TOMASETTI, 2011. In vitro effect of aspartame in angiogenesis induction. *Toxicology in vitro*. 25, 286–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.002>.

ALSUHAIBANI, E.S., 2010. In Vivo Cytogenetic Studies on Aspartame. *Comparative and Functional Genomics*. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/605921>.

AMCHOVA, P., KOTILOVA, H., RUDA-KUCEROVA, J., 2015. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 73, 914-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>.

BANDYOPADHYAY, A., GHOSHAL, S., MUKHERJEE, A., 2008. Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug and chemical toxicology*. 31(4), 447–57. doi: 10.1080/01480540802390270.

BANNWART, G.C.M.C., 2000. Avaliação da ingestão potencial dos antioxidantes butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno e terc-butilhidroquinona. 2000. f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

BASU, A., KUMAR, G.S., 2016. Multispectroscopic and calorimetric studies on the binding of the food colorant tartrazine with human hemoglobin. *Journal of Hazardous Materials*. 318, 468–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.023>.

BASU, A., KUMAR, G.S., 2015. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. *Food Chemistry*. 175, 137–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.141>.

BRAEUNING, A., VETTER S, ORSETTI S, SCHWARZ M., 2012. Paradoxical cytotoxicity of tert-butylhydroquinone in vitro: What kills the untreated cells?. *Archives of toxicology*. 86 (9) 1481–87. doi:10.1007/s00204-012-0841-3.

BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M., SALMINEN, S., THORNGATE III, J.H., 2002. *Food Additives*. 2ª Ed. Marcel Dekker Inc. 938.

CHOWDHURY, S.M., LALWANI, G., ZHANG, K., YANG, J.Y., NEVILLE, K., SITHARAMAN, B., 2013. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. *Biomaterials*. 34, 283-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.057>.

ESKANDANI, M., HAMISHEHKAR, H., DOLATABADI, J.E.N., 2014. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food chemistry*. 153, 315–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.087>.

FRESHNEY, R.I., 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th Ed., John Wiley & Sons, Inc.

GOLDSMITH, L. A., 2000. Acute and Subchronic Toxicity of Sucralose. *Food and Chemical Toxicology*. 38 (2), 53-69. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00028-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00028-4).

GRILLO, C.A., DULOUT, F.N., 1997. The effect of butylated hydroxytoluene on the chromosomal damage induced by bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*. 375, 83–89. [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(96\)00256-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(96)00256-4).

HAN, Y. H., MOON, H.J., YOU, B.R., YANG, Y.M., KIM, S.Z., KIM, S.H., PARK, W.H., 2010. Propyl gallate inhibits the growth of calf pulmonary arterial endothelial cells via glutathione depletion. *Toxicology in vitro*. 24 (4), 1183–89. Doi: 10.3892/ijmm_00000425

HUSØY, T., MANGSCHOU, B., FOTLAND, T.Ø., KOLSET, S.O., NØTVIK JAKOBSEN, H., TØMMERBERG, I., BERGSTEN, C., ALEXANDER, J., FROST ANDERSEN, L., 2008. Reducing added sugar intake in Norway by replacing sugar sweetened beverages with beverages containing intense sweeteners – A risk benefit assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 3099–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.013>

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1983. 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2), in: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Some food Additives, Feed Additives and Naturally Occurring Substances*, World Health Organization. 31, p.47.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1975b. p-Dimethylaminoazobenzene, in: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Some Aromatic Azo Compounds*, World Health Organization. 8, 125–39.

INTERNATIONAL STANDARD: *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods*. ISO 10993-5:2009.

IVERSON, F., 1995. Phenolic antioxidants: health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. *Cancer Letters*. 93, 49-54. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03787-W](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(95)03787-W).

JEFFREY, A.M., WILLIAMS, G.M., 2000. Lack of DNA-damaging Activity of Five Non-nutritive Sweeteners in the Rat Hepatocyte/DNA Repair Assay. *Food and Chemical Toxicology*. 38, 335-38. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00163-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00163-5).

- KARSTADT, M., 2010. Inadequate Toxicity Tests of Food Additive Acesulfame. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. 6, 89–96. Doi: 10.1179/107735210800546092.
- KARSTADT, M., 2006. Testing Needed for Acesulfame Potassium, an Artificial Sweetener. *Environmental Health Perspectives*. 114 (9).
- KILLE, J. W., Tesh, J.M., McAnulty, P.A., Ross, F.W., Willoughby, C.R., Bailey, G.P., Wilby, O.K., Tesh, S.A., 2000. Sucralose: assessment of teratogenic potential in the rat and the rabbit. *Food and chemical toxicology*. 38 (Suppl 2), S43–52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00027-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00027-2)
- KIM, J.Y., PARK, K., KIM, J., CHOI, I., CHO, K., 2015. Modified High-Density Lipoproteins by Artificial Sweetener, Aspartame, and Saccharin, Showed Loss of Anti-atherosclerotic Activity and Toxicity in Zebrafish. *CardiovascToxicol*. 15, 79–89. DOI: 10.1007/s12012-014-9273-z
- KUS, E., EROGLU, H.E., 2015. Genotoxic and cytotoxic effects of Sunset Yellow and Brilliant Blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28 (1), 227-30.
- LI, L., WU, Y., WU, X., WANG, H., BAI, Y., WANG, X., AKINGBEMI, B.T., HUANG, P., GE, R.S., 2016a. Butylated Hydroxyanisole Potently Inhibits Rat and Human 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2. *Pharmacology*. 97,(1-2), 10-7. DOI:10.1159/000441034
- LI, X., CAO, S., MAO, B., BAI, Y., CHEN, X., WANG, X., WU, Y., LI, L., LIN, H., LIAN, Q., HUANG, P., GE, R.S., 2016b. Effects of butylated hydroxyanisole on the steroidogenesis of rat immature Leydig cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 26 (7), 511-19. DOI: 10.1080/15376516.2016.1202367
- LYGRE, H., MOE, G., SOLHEIM, E., GJERDET, N.R., 1995. Biological testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. *Acta Odontologica Scandinavica*. 53: 397-401.
- MASONE, D., CHANFORAN, C., 2015. Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational Biology and Chemistry*. 56, 152–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.04.006>.
- MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- MPOUNTOUKAS, P., PANTAZAKI, A., KOSTARELI, E., CHRISTODOULOU, P., KARELI, D., POLILIOU, S., MOURELATOS, C., LAMBROPOULOU, V., LIALIARIS, T., 2010. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants

amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and chemical toxicology*. 48 (10), 2934–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.030>.

MUKHERJEE, A., CHAKRABARTI, J., 1997. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K-a non-nutritive sweetener. *Food and chemical toxicology*. 35 (12), 1177–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)85469-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(97)85469-5).

MUKHOPADHYAYI, M., MUKHERJEE, A., CHAKRABARTI, J., 2000. In Vivo Cytogenetic Studies on Blends of Aspartame and Acesulfame-K. *Food and Chemical Toxicology*. 38, 75±77. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00115-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00115-5).

OIKAWA, S., NISHINO, K., OIKAWA, S., INOUE, S., MIZUTANI, T., KAWANISHI, S., 1998. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Biochemical pharmacology*, 56 (3), 361–70. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00037-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00037-9).

PALMNAS, M.S.A., COWAN, T.E., BOMHOF, M.R., SU, J., REIMER, R.A., VOGEL, H.J., HITTEL, D.S., SHEARER, J., 2014. Low-Dose Aspartame Consumption Differentially Affects Gut Microbiota-Host Metabolic Interactions in the Diet-Induced Obese Rat. *PlosOne*. 9, ed. 10. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>.

POLÔNIO, M.L.T., PERES, F., 2009. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Caderno de Saúde Pública*. 25 (8), 1653-66. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009000800002>.

POUL, M., JARRY, G., ELHKIM, M.O., POUL, J.M., 2009. 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*. 47 (2), 443–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.034>.

RAHIMAN, F., POOL, E. J., 2014. The in vitro effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. *Journal of immunoassay & immunochemistry*. 35 (1), 26–36. DOI: 10.1080/15321819.2013.784197.

RODERO, A.B., RODERO, L.S., AZOUBEL, R., 2009. Toxicity of Sucralose in Humans: A Review. *International Journal of Morphology*. 27 (1), 239-44. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022009000100040>.

SASAKI, Y. F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K., TSUDA, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation research*. 519 (1-2), 103–19. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00128-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00128-6).

SCHERLIESS, R., 2011. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 411, 98–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.053>.

SOFFRITTI, M., BELPOGGI, F., TIBALDI, E., ESPOSTI, D.D., LAURIOLA, M., 2007. Life-span exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats. *Environmental health perspectives*. 115 (9), 1293–7. DOI: 10.1289/ehp.10271

STEVENS, L.J., KUCZEK, T., BURGESS, J.R., STOCHELSKI, M.A., ARNOLD, L.E., GALLAND, L., 2013. Mechanisms of behavioral, atopic, and other reactions to artificial food colors in children. *Nutrition Reviews*. 71 (5), 268-81. <http://dx.doi.org/10.1111/nure.12023>

VAN EYK, A. D., 2015. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and chemical toxicology*. 38 (3), 318–27. DOI: 10.3109/01480545.2014.966381

VANDGHANOONI, S., FOROUHARMEHR, A., ESKANDANI, M., BARZEGARI, A., KAFIL, V., KASHANIAN, S., DOLATABADI J., E.N., 2013. Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. *DNA and cell biology*. 32 (3)98–103. DOI:10.1089/dna.2012.1946

VOJDANI, A., VOJDANI, C., 2015. Immune reactivity to food coloring. *Alternative therapies in health and medicine*. 21 (Suppl 1), 52–62.

WEYERMANN, J., LOCHMANN, D., ZIMMER, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. 288, 369–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.018>

WHITEHOUSE, C.R., BOULLATA, J., MCCAULEY, L.A., 2008. The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *AAOHN Journal*. 56 (6), 251-9. DOI: 10.1177/216507990805600604.

WILLIAMS, G. M., IATROPOULOS, M. J., WHYSNER, J., 1999. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. *Food and Chemical Toxicology*. 37, 1027-38. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00085-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00085-X).

World Health Organization (WHO). Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acessado em 06/03/2015.

YANG, Q., 2010. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 83, 101-08. DOI: 10.1016/j.appet.2012.10.009