

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



**Detecção da genotoxicidade dos corantes
artificiais Amarelo Tartrazina e Vermelho 40,
pelo teste SMART de asa, em *Drosophila
melanogaster***

Aluna: Karyna Maria de Mello Locatelli

Orientador: Dr. Júlio César Nepomuceno

Uberlândia – MG

2008

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Detecção da genotoxicidade dos corantes
artificiais Amarelo Tartrazina e Vermelho 40, pelo
teste SMART de asa, em *Drosophila melanogaster***

Aluna: Karyna Maria de Mello Locatelli

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como Parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Genética)

UBERLÂNDIA – MG

2008

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Detecção da genotoxicidade dos corantes
artificiais Amarelo Tartrazina e Vermelho 40, pelo
teste SMART de asa, em *Drosophila melanogaster***

Aluna: Karyna Maria de Mello Locatelli

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Júlio César Nepomuceno

Examinadores: Dra. Sandra Morelli

Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Data da defesa: 28/2/2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Dr. Júlio César Nepomuceno

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L811d Locatelli, Karyna Maria de Mello, 1977-

Detecção da genotoxicidade dos corantes artificiais amarelo tartazina e vermelho 40, pelo teste SMART de asa, em *Drosophila melanogaster* / Karyna Maria de Mello Locatelli. - 2008.

45 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Mutagênese - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bio-química. III. Título.

CDU: 575.224.4

Dedicatória

À Deus, único Pai que me ilumina, me guia por todos os caminhos e possibilita vencer mais um desafio com a realização deste trabalho

À minha mãe, Maria de Lourdes Nogueira Mello, por ser meu ponto de apoio e referência em todos os momentos, sejam eles difíceis ou alegres.

Ao meu filho, João Henrique Mello Locatelli, e ao meu marido, André Augusto Locatelli, por me oferecerem sempre um sorriso quando chego em casa.

Agradecimentos Especiais

Ao meu pai,

Fernando Corrêa de Mello

Aos meus irmãos,

Lúcia Helena de Mello Ribeiro, Margareth Maria de Mello,
Fernando Corrêa de Mello Júnior e André Luis Corrêa de Mello.

Aos meus sobrinhos, em especial a Luciana Mello Ribeiro e
a Ana Cecília Mello Ribeiro

Pelo carinho e apoio e principalmente por cuidarem do meu filho nos
momentos que tive que me ausentar.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, em
especial a Bethânia Cristhine de Araújo, querida “Tia Beth”, sem a
qual a realização deste trabalho seria impossível. Obrigada pelo apoio
e por seus conhecimentos.

Agradecimentos

Ser mestre não é apenas lecionar, ensinar não é apenas transmitir o conteúdo programático. Ser mestre é ser orientador e amigo, guia e companheiro, é caminhar com o aluno passo a passo. É transmitir a este os segredos da caminhada. Ser mestre é ser exemplo de dedicação, de doação e dignidade pessoal. Meus agradecimentos sinceros ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, pelos seus ensinamento e disponibilidade em me ajudar.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em ler este trabalho e propor as devidas sugestões

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*

Ao Centro Universitário de Patos de Minas, **UNIPAM**, em especial o diretor da Faculdade de Ciências da Saúde, **Dirceu Deocleciano Pacheco**, pelo apoio e compreensão.

Sumário

Capítulo I – Fundamentação Teórica

	Página
Introdução Geral	01
1.1 Aditivos Alimentares	01
1.2 Corantes Artificiais Amarelo Tartrazina e Vermelho 40	04
1.3 Controles Positivos: Uretano e Doxorrubicina	07
1.4 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	08
Referências Bibliográficas	12

Capítulo Único

Resumo	18
Abstract	19
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	22
2.1 Agentes Químicos	22
2.2 Linhagens estoques	23
2.3 Coleta de larvas	23
2.4 Procedimento experimental	24
2.5 Preparação e análise microscópica das asas	24
2.6 Análise estatística	25
3. Resultados e discussão	26
4. Referências bibliográficas	31

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Freqüência de manchas mutantes, observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores-heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, dos cruzamentos padrão e alta bioativação, tratados com corante artificial Tartrazina em três diferentes concentrações 29

Tabela 2. Freqüência de manchas mutantes, observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, dos cruzamentos padrão e alta bioativação, tratados com corante artificial Vermelho 40 em três diferentes concentrações 30

Lista de Figuras

Capítulo 1

	Página
Figura 1. Fórmula estrutural do corante Tartrazina	06
Figura 2. Fórmula estrutural do corante Vermelho 40	06
Figura 3. Fórmula estrutural do Uretano	07
Figura 4. Formula estrutural da Doxorrubicina	07
Figura 5. Tipos de manchas	11
Figura 6. Fenótipo das asas	11

Capítulo Único

	Página
Figura 1. Fórmula estrutural do corante Tartrazina	22
Figura 2. Fórmula estrutural do corante Vermelho 40	22

Lista de Abreviaturas

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DXR – Doxorrubicina

URE – Uretano

Fir³ – *Flare*

HB – *High Bioactivation Cross*

MH – Marcador trans-Heterozigoto

mM – Milimolar

mwh – *multiple wing hairs*

ORR – Oregon R (R)

SMART – *Somatic Mutation And Recombination Test*

ST – Standard Cross

TM3 bd^s – *Third Multiple3 Beaded Serrate*

SVS/ MS – Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde

CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões Alimentares

OMS – Organização Mundial da Saúde

FAO – *Food and Agriculture Organization*

ADI – Consumo Aceitável

BH – Balanceador Hererozigoto

Apresentação

Os aditivos alimentares são ingredientes adicionados propositalmente em alimentos durante as etapas de produção, com o objetivo de realçar suas características organolépticas e sensoriais.

Os corantes são aditivos alimentares e podem ser subdivididos em corante orgânico natural, artificial e sintético, corante inorgânico ou pigmento e caramelo. Os corantes artificiais têm maior poder de fixação do que os naturais.

A genotoxicidade estuda os mecanismos de alteração do DNA, bem como a alteração do determinismo genético celular ou orgânico.

Os corantes são considerados os aditivos alimentares mais genotóxicos e, dentre estes, os artificiais que apresentam a estrutura química com o grupamento azóico, como o amarelo tartrazina e o vermelho 40, estão sendo relacionados com o desenvolvimento do câncer no intestino, estômago, cólon e/ou bexiga urinária. O corante tartrazina também tem sido relacionado, em alguns estudos, como agente causador de reações alérgicas

Este trabalho teve por objetivo avaliar a genotoxicidade de corantes artificiais, que possuem o grupamento azóico: amarelo tartrazina e vermelho 40, através do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), uma vez que estes corantes são utilizados em vários produtos alimentícios que são consumidos em larga escala, como, por exemplo, refrescos, refrigerantes, chocolates, queijos, biscoitos, gelatinas, gomas de mascar, iogurtes.

Capítulo I – Fundamentação Teórica

1.1 Aditivos alimentares

Um dos maiores desafios para o homem, desde a sua existência, está relacionado à alimentação. Nos primeiros núcleos humanos, a exploração dos diversos tipos de alimentação disponíveis na natureza, era mais simples, porém as necessidades de deslocamento para outras regiões e o esgotamento das reservas naturais, obrigaram os indivíduos a preocuparem-se em produzir mais alimentos e, principalmente, conservá-los para serem consumidos em períodos de escassez.

Atualmente, há uma grande procura para encontrar aditivos para serem adicionados intencionalmente nos produtos alimentícios, melhorando ou realçando alguma ou várias características, tais como: visual, odor, sabor, cor, textura, grau de umidade (Calil e Aguiar, 1999).

Segundo o Item 1.2 da Portaria SVS/MS 540/97 (Brasil, 2002) aditivo é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais (durante sua fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação) sem o propósito de nutrir.

A aceitação do produto alimentício pelo consumidor está diretamente relacionada a sua cor. Esta característica sensorial, embora subjetiva, é fundamental na indução da sensação global, resultante de outras características como o aroma, o sabor e a textura dos alimentos. (Collins e Plumbly, 1995; Freund et al., 1988 input Constant et al, 2002).

Com a função de melhorar a cor dos alimentos, a indústria alimentícia investiu no desenvolvimento de corantes a partir de novas tecnologias de fabricação. Assim, começaram a atuar neste campo colorindo os mais diferentes tipos de produtos alimentícios, melhorando, por consequência, suas vendas.

De acordo com a resolução 44/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde (Brasil, 2002c), os

corantes, permitidos para uso em alimentos e bebidas, são classificados da seguinte forma: corante orgânico natural é aquele obtido a partir de vegetal ou, eventualmente, de animal, cujo princípio do corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado; corante orgânico artificial é aquele obtido por síntese orgânica, mediante o emprego de processos tecnológicos adequados e não encontrado em produtos naturais; corante orgânico sintético idêntico ao natural é o corante cuja estrutura química é semelhante a do princípio isolado do corante orgânico natural; corante inorgânico ou pigmento é aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados ao seu emprego em alimentos; caramelo obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.

Os corantes artificiais têm maior poder de fixação do que os naturais, propiciando cores mais intensas, aumentando o número de tonalidade, com maior estabilidade e menor custo (Calil e Aguiar, 1999).

Nas primeiras décadas do século XX já existiam, em todo mundo, mais de 80 corantes sintéticos disponíveis para alimentos. Entretanto, não havia qualquer regulamentação sobre seus usos ou graus de pureza (Queija et al., 2001).

Com a utilização cada vez maior desses aditivos, os países começaram a estabelecer legislações para controlar seu uso. Organizações internacionais, como a Comissão do Codex Alimentarius, organismo subsidiário da FAO (Food and Agriculture Organization) e da OMS (Organização Mundial da Saúde), foram criados para, entre outros objetivos, estabelecer especificações e critérios para a utilização de aditivos alimentares, incluindo o uso de corantes em alimentos (Downham e Collins, 2000).

Alguns fabricantes garantem que os corantes não trazem nenhum prejuízo à saúde humana. O mesmo não se pode dizer da maior parte dos corantes artificiais, os corantes azóicos (produzidos a partir de derivados de petróleo), que não são seguros à saúde humana (Calil e Aguiar, 1999).

Cada aditivo aprovado para uso nos alimentos passa por testes rigorosos, porém, diversos produtos alimentícios são fabricados a partir da mistura de ingredientes, os quais, em certos casos, contém aditivos, que serão diluídos e por isto, não constarão no rótulo dos alimentos. Isto mostra a complexidade e a dificuldade para uma avaliação segura de uma determinada substância química.

Os corantes artificiais permitidos no Brasil são o amarelo crepúsculo, azul brilhante FCF, bordeaux S ou amaranço, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina e o vermelho 40 (Damasceno, 1988).

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

A mutagenicidade e a carcinogenicidade estão claramente correlacionadas. Um estudo mostrou que de 157 dos 175 carcinógenos conhecidos (90%) também são mutagênicos. A teoria de mutação somática do câncer diz que estes agentes causam câncer induzindo à mutação de células somáticas (Suzuki et al., 2002).

No decorrer da vida o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular (Ribeiro e Marques, 2003). Danos ao DNA são considerados os principais eventos causados por agentes genotóxicos, que levam às mudanças hereditárias e ao desenvolvimento do câncer. Estes danos podem induzir morte celular ou eventos mutacionais e, também, iniciar uma transformação maligna (Moustacchi, 2000). Assim, compreendemos que o câncer é uma doença genética das células somáticas, onde os mecanismos de segurança contra falhas estão inoperantes, e as células cancerosas proliferam sem controle (Suzuki et al., 2002).

Os proto-oncogenes, assim como os genes supressores de tumor e de reparo, desempenham importante papel na célula. As funções normais dos genes supressores de tumor se enquadram em categorias complementares às dos proto-oncogenes, que controlam o crescimento e proliferação celular, enquanto que genes de reparo são responsáveis pela expressão de proteínas que promovem os reparos nos erros ocorridos durante o processo de replicação do DNA. Enzimas de reparo, presentes em células vivas, diminuem os danos genéticos, evitando, assim, muitas mutações (Ojopi e Dias-Neto, 2002). A maioria das alterações genéticas que originam o câncer ocorre nos genes que controlam a proliferação celular.

1.2 Corantes artificiais: Amarelo Tartrazina e Vermelho 40

Corantes artificiais são pigmentos ou tintas sintéticas, que possuem uma estrutura química própria, cujo grupo é conhecido como diazo ou azo ou azóico. A maioria é obtido através do alcatrão do carvão mineral (Calil e Aguiar, 1999).

Os corantes são usados para dar cor a uma ampla variedade de materiais tais como tecidos, cosméticos, medicamentos e alimentos (Tripathy et al., 1995). Além destes, são usados extensivamente, em laboratórios, como pigmento biológico ou indicador de pH (Chung, 1983).

Embora a adição de corantes em alimentos seja muito usada, foi comprovada a toxicidade destes produtos. Por isso, é importante considerar o risco do uso de corantes contra seus benefícios (Tripathy et al., 1995).

De todos os aditivos usados em alimentos, os corantes são os mais genotóxicos (Sasaki et al., 2002). O câncer intestinal é bastante comum em países altamente industrializados, há a possibilidade de existir conexão entre o aumento do número de câncer e o uso de corantes azóicos (Chung, 1983).

Os corantes azóicos mais utilizados pela indústria alimentícia são: amaranto, vermelho 40, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina. O primeiro, também conhecido como vermelho Bordeaux, proporciona coloração vermelha aos produtos que foram adicionados, assim como o vermelho 40. Os dois últimos proporcionam coloração amarela (Calil e Aguiar, 1999).

Os produtos onde estes corantes são mais utilizados são: alimentos processados a base de cereais, balas, caramelos e similares, cerejas em calda (somente para reconstituição da cor), coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas, gelados comestíveis, geléia de cereja, gomas de mascar, iogurtes aromatizados, leites aromatizados, leites fermentados aromatizados, leites gelificados aromatizados, licores, preparados líquidos ou sólidos para refrescos e refrigerantes, produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijo tipo petit-suisse e similares, queijos, recheios de bombons e similares, recheios de chocolates, recheios e revestimentos de produtos de confeitaria, biscoitos e similares (com exceção dos recheios de creme de ovos), refrescos e refrigerantes, sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares, xaropes para refrescos. (Calil e Aguiar, 1999)

Os corantes azóicos são degradados pelos microorganismos intestinais, e é possível que a toxicidade e/ou a carcinogenicidade pode ser devido aos produtos degradados destes corantes. (Chung, et al., 1978)

O corante artificial tartrazina (CI No 19140) é um dos mais usados em todo o mundo, para corar alimentos (Arden e Ram, 2001), medicamentos e cosméticos. É um derivado nitroso, sabidamente causador de reações alérgicas como asma e urticária (Bathia, 2000, Elhkim, et al., 2007) e tem sido alvo de estudos de mutagênese e carcinogênese por produzir, como todos os corantes azóicos uma amina aromática ácido sulfanílico, após ser metabolizado pela microflora gastrintestinal (Moutinho; Bertges e Assis, 2007).

Em contradição, um estudo realizado por Nettis et al. (2003) mostrou que a porcentagem de urticária e/ou angioedema induzido pela tartrazina foi muito baixa (1%). O estudo sugere que nos pacientes com estas ocorrências, atribuídas a tartrazina, deveria ter, a sua causa, mais bem investigada.

O uso de aditivos em alimentos pode levar a estimulação do processo mitótico. Isto pode contribuir para investigação da ação dos aditivos nas células, desde estímulos mitóticos à susceptibilidade para carcinogênicos químicos (Stefanidou et al., 2003).

Estudo realizado por Moutinho; Bertges e Assis (2007) em 45 ratos Wistar, machos, recebendo diariamente tartrazina mostrou um aumento significativo do numero de linfócitos e eosinófilos, porém, não foram observadas induções da carcinogênese. O corante tartrazina permanece entre os possíveis carcinógenos alimentares por ser da classe azo.

A FAO (Food and Agriculture Organization) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) estabeleceram o consumo aceitável (ADI) em 7,5 mg/kg para o corante tartrazina, e de 7,0 mg/kg para o vermelho 40 (Sasaki, et al., 2002; Husain, et al., 2006; Elhkim, et al., 2007).

Estudo realizado por Sasaki, et al. (2002) os corantes Vermelho 40 (CI No 16035) e Tartrazina induziram dano no DNA em estômago, cólon e/ou bexiga urinária com dose de 10mg/kg para a tartrazina e 100 mg/kg para o vermelho 40. Estas doses são próximas as aceitáveis para o consumo pela ADIs.

Estrutura Química do Corante Amarelo Tartrazina e Vermelho 40

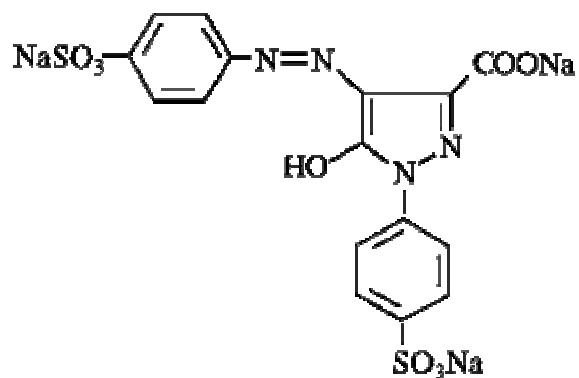


Figura 1 Corante Amarelo Tartrazina

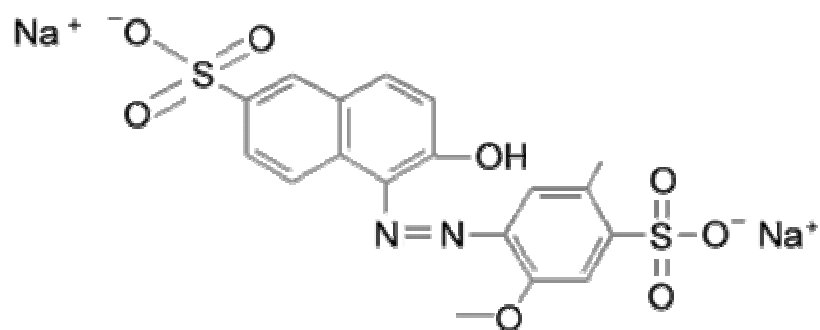


Figura 2 Corante Vermelho 40

1.3 – Controles positivos: Uretano e Doxorrubicina

Etilcarbamato (CAS N^o 51-79-6, PM 89,10), conhecido como uretano (URE), foi utilizado no experimento como controle positivo. É um antineoplásico capaz de induzir mutações. É também utilizado como anestésico veterinário.

A doxorrubicina é um antibiótico antracíclico produzido pelo fungo *Streptomyces peucelii* var. *cesius* utilizado como antineoplásico inibindo a ação da topoisomerase II. (Chiuchetta e Castro-Prado, 2002). A doxorrubicina é considerado importante na mutagenicidade oxidativa uma vez que possui uma alta afinidade por ferro inorgânico formando assim, um complexo doxorrubicina-Fe (Kostoryz e Yourtee, 2001)



Figura 3 Estrutura química do uretano

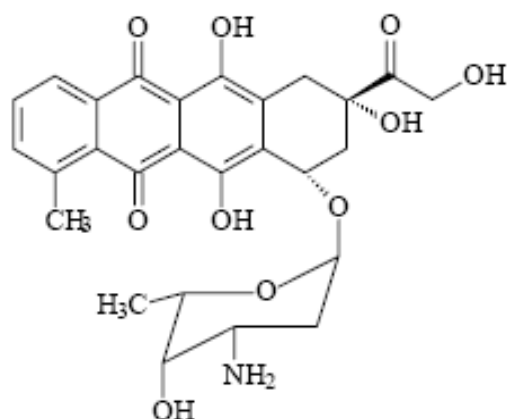


Figura 4 Estrutura química do quimioterápico Doxorrubicina

1.4 – Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em células da asa de *Drosophila melanogaster*

A Genética Toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e, mais recentemente, eventos aneuploidogênicos (Andrade e Lehmann, 2003).

Nos últimos anos, o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) tem sido muito usado, e tem mostrado ser muito eficiente e adequado, tanto para análise de genotoxicidade, quanto de antigenotoxicidade de compostos químicos e agentes físicos (Graf et al., 1998).

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), descrito por Graf et al. (1984), é utilizado para detecção de atividade mutagênica e recombinogênica ou deleção ocorridas no cromossomo 3 de *Drosophila melanogaster*. É um teste rápido, de fácil realização e baixo custo. Nele, as larvas trans heterozigotas são expostas aos componentes testes por períodos de tempo variados (Graf et al., 1984).

O teste SMART de asas de *Drosophila melanogaster*, fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células, chamados de discos imaginais, proliferam, mitoticamente, até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas (Andrade e Lehmann, 2003).

Há mais de 50 anos, o uso de insetos, especialmente *Drosophila*, para monitorar danos genéticos por agentes químicos, é feito intensamente em pesquisas de mutação, em testes de curta duração, para identificar produtos genotóxicos (Vogel et al., 1999).

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca da fruta, oferece vantagens metodológicas para detecção de genotoxicidade de substâncias químicas (Graf et al., 1984) como: pequeno tamanho, de fácil acondicionamento, curto tempo de geração (aproximadamente 10 dias a 25° C), grande progênie e baixo número de cromossomos (Graf e Singer, 1992); é capaz de ativar enzimaticamente promutágenos e procarcinógenos (Graf et al., 1996). A *D. melanogaster* é um eucarionte eficiente em teste de genotoxicidade, porque a avaliação é feita *in vivo*, com grande flexibilidade de administração de protocolo,

tanto de compostos puros como avaliação de misturas complexas (Graf et al., 1998). O teste é sensível, também, na avaliação de atividade genotóxica de promutágenos e procarcinógenos (Graf e Singer, 1992).

Os estoques são mantidos em frascos de 250 mL, contendo meio de cultura para *Drosophila melanogaster*, preparado com 820 mL de água, 25 g de fermento biológico (*S. cerevisiae*), 11 g de ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagin; a temperatura média de 25° C e repicados a cada quinze dias.

No SMART são usados os marcadores: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr³*, 3-38,8), e é baseado no princípio da perda da heterozigose para estes marcadores. Os dois genes *mwh* (*multiple wing hairs*) e *flr³* (*flare³*), encontrados no cromossomo 3, têm expressões fenotípicas bem distintas. No *mwh*, ao invés de nascer apenas um pêlo ou tricoma por célula, nascem múltiplos, geralmente três (figura 5 – A). O marcador *multiple wing hairs* é mantido na linhagem como uma mutação viável em homozigose recessiva, e encontra-se localizado na extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 (3-0,3) (Graf et al., 1984, 1989 e 1998).

O marcador *flare³* (*flr³*) é uma mutação recessiva que afeta a forma do pêlo da asa, que ao invés de nascer um tricoma normal, nasce em forma de chama (figura 5 – B). Também localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, mas em posição proximal (3-38,8). O gene *flr³* é letal em homozigose recessiva nos zigotos (não são capazes de desenvolver moscas adultas). Ao contrário, células homozigotas do disco imaginal são viáveis e levam à formação de células mutantes nas asas. Para o gene *flr³* permanecer na linhagem estoque, é necessária a presença de um balanceador gênico, com múltiplas inversões (*TM3, Bd^S*: *Third Multiple 3, Beaded – Serrate*). (Graf et al., 1984, 1989 e 1998).

A linhagem *ORR* foi desenvolvida com o objetivo de aumentar a capacidade metabólica, para ativar promutágenos. O gene *R1* da linhagem Oregon R (R) que confere a resistência para DDT, foi inserido na posição 65,0 no cromossomo 2, que é responsável pela alta expressão constitutiva das enzimas citocromo P450. Os cromossomos 1 e 2 de linhagens originais *mwh* e *flr³* foram substituídos pelos cromossomos 1 e 2 da linhagem Oregon R (R). A linhagem *ORR* é igual a linhagem *flr³*, com a inserção do gene *R1* no cromossomo 2. (Frölich e Würigler, 1989).

Para a realização do teste são feitos dois tipos de cruzamentos: Cruzamento padrão (ST – Standard Cross) com fêmeas virgens *flr³* cruzadas com machos *mwh* e o cruzamento da alta bioativação (HB – High Bioactivation Cross) com fêmeas Virgens *ORR/ORR; flr³* cruzadas com machos *mwh*.

A partir desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes que diferenciam-se fenotipicamente no formato da asa. Os descendentes que possuem o marcador trans-heterozigotos (MH: *mwh +/+ flr³*) obtidos através do cruzamento padrão possuem as asas fenotipicamente do tipo selvagem, ou seja com a borda lisa (figura 6 – A). Já os descendentes do cruzamento de alta bioativação, ou seja, que possuem o marcador balanceador heterozigoto (BH: *mwh +/+ TM3, Bds*) possuem as asas com as bordas serrilhadas (figura 6 – B)

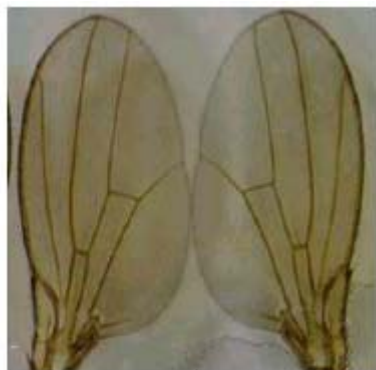


A



B

Figura 5: Manchas mutantes A – Mancha simples: pêlos *mwh*. B – Mancha gêmea: pêlos *flare* e *mwh*



A



B

Figura 6: Fenótipo da Borda da Asa A – Asa de Borda lisa. B – Asa de Borda Serrilhada

2 – Referências Bibliográficas

Andrade HHR, Lehmann M. 2003. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK Mutagênese Ambiental. Editora da Ulbra. Canoas. p.281-307.

Arden KD; Ram FS. 2001 Tatzazine exclusion for allergic asthma. Cochrane Database Syst Ver; (4):CD000460.

Bhatia MS. 2000. Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. J Clin Psychiatry; 61(7):473-6, Jul.

BRASIL. ANVISA. Resolução no 44/77, de 1977 (DOU – Seção I, 01/02/78 e 24/04/78). Disponível: <http://www.anvisa.gov.br>. 2002c. Acesso em 10/07/2007

BRASIL. ANVISA. Portaria no 540/97, de 27 de outubro de 1997. (DOU de 28/10/97) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. 2002a. Acesso em 10/07/2007

Calil RM; Aguiar JA. 1999. Aditivos nos alimentos. Câmara Brasileira do Livro. São Paulo.

Chiuchetta e Castro-Prado. 2002. Doxorubicin and etoposide induce somatic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. Braz. J. Microbiol. Vol33 no.3 São Paulo July/Sept.

Chung KT. 1983. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis os azo dyes. Mutat Res Apr 114:269-81.

Chung, K; Fulk, G; Egan, M. 1978. Reduction of Azo Dyes by Intestinal Anaerobes. Applied and Environmental Microbiology. V.35, n.3. p.558-562.

Collins, P.; Plumbly, J. 1995. Natural colors: stable future? Food Tech Europe, v.49, n.2, p.64-70.

Damasceno, V. 1988. Guerra dos corantes sintéticos ressuscita os naturais. Química e Derivados, v. 24, n. 250, p.10-21.

Downham A, Collins P. 2000. Colouring our Food in The Last and Next Millennium. International Journal of Food Science and Technology. 35, 5-22.

Elhkim MO; Héraud F; Bemrah N; Gauchard F; Lorino T; Lambré C; Frémy JM; Poul JM. 2007. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. Regul Toxicol Pharmacol;47(3):308-16.

Erdtmann B. 2003. A genotoxicidade nossa de cada dia. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques J.A.P Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance p. 23-46.

Freund, P.R.; Washan, C.J.; Maggion, M. Natural color for use in foods. Cereal Foods World, v.33, n.7, p.553-559, 1988. in put Constant, PBL; Stringheta, PC; Sandi, D. 2002. B.CEPPA, Curitiba, v. 20, n. 2, jul./dez. 2002 B.CEPPA, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul./dez. 2002

Frölich A, Würigler FE. 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* Wing-spot test. Mutat Res 216:179-187.

Graf U, Singer D. 1992. Genotoxicidade testing of promutagens in the wing Somatic Mutations and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Ver Int Contam Ambient 8(1):15-27.

Graf U, Würigler FE, Katz AI, Frei H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Env Mol Mutagen 6:153-188.

Graf U, Frei AK, Katz AJ, Würigler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222:359-373.

Graf U, Spanó MA, Guzmán-Rincón J, Abraham SK, Andrade HHR. 1996. The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: Na efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *African Newsletter on Occupational Health and Safety* 6(1):9-13.

Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J, Würigler FE. 1998. Antigenotoxicity Studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402:203-209.

Husain A; Sawaya W; Al-Omair A; Al-Zenki S; Al-Amiri H; Ahmed N; Al-Sinan M. 2006. Estimates of dietary exposure of children to artificial food colours in Kuwait.. *Food Addit Contam*;23(3):245-51, 2006 Mar.

Kostoryz, E.L., Yourtee, DM. 2001. Oxidative mutagenesis of doxorubicin-Fe(III) complex. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 490(2), p. 131-139.

Moustacchi E. 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res* 464:35-40.

Moutinho, I. L. D; Bertges, L. C; Assis, R. V. C. 2007. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow nº 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Braz. j. biol*;67(1):141-145, Feb.

Nettis E; Colanardi MC; Ferrannini A; Tursi A. 2003. Suspected tartrazine-induced acute urticaria/angioedema is only rarely reproducible by oral rechallenge *Clin Exp Allergy*;33(12):1725-9, Dec.

Ojopi EPB, Dias-Neto E. 2002. Genes e câncer. *Revista: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 27:28-38.

Queija C, Queirós MA, Rodrigues LM. 2001. A cor dos alimentos. Química – Boletim da Sociedade Portuguesa de Química. 80, 6-11.

Ribeiro LR, Marques EK. 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK Mutagênese Ambiental. Editora da Ulbra. Canoas. P.21-27.

Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita A, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mutat Res. Aug 519:103-19.

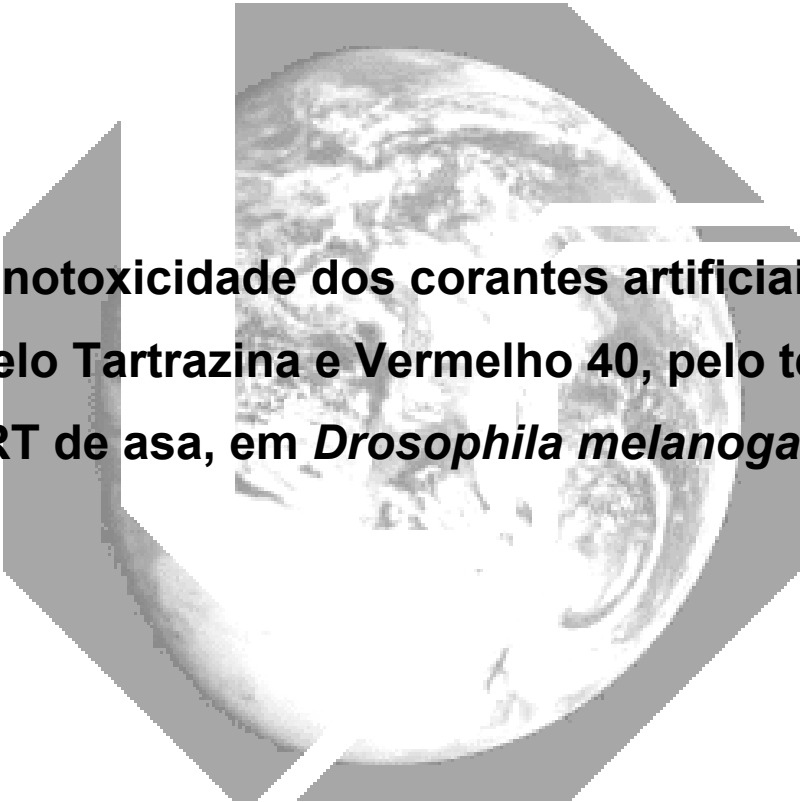
Stefanidou M, Alevisopoulos G, Chatziioannou A, Koutselinis A. 2003. Assessing food additive toxicity using a cell model. Vet Hum Toxicol; 45(2):103-5.

Suzuki DT, Griffiths AJF, Miller JH, Lewontin RC, Gelbart WM. 2002. Introdução à Genética. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Tripathy NK, Nabi Mj, Sahu GP, Kumar AA. 1995. Genotoxicity testing of two red dyes in the somatic and germ line cells of *Drosophila*. Food Chem Toxicol Nov 33:923-7.

Vogel EW, Graf U, Frei HJ, Nivard MMJ. 1999. The results of assay in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. International Agency for Research on Cancer 146:427-470.

Capítulo Único



**Genotoxicidade dos corantes artificiais
Amarelo Tartrazina e Vermelho 40, pelo teste
SMART de asa, em *Drosophila melanogaster***

Sumário

Capítulo Único

1. Introdução	19
Resumo.....	21
Abstract	22
2. Material e Métodos.....	23
2.1 Agentes Químicos.....	23
2.2 Linhagens estoques	24
2.3 Coleta de larvas	25
2.4 Procedimento experimental.....	25
2.5 Preparação e análise microscópica das asas.....	26
2.6 Análise estatística	27
3. Resultados e discussão.....	28
4. Referências bibliográficas.....	33

Resumo

Os aditivos alimentares são utilizados pela indústria alimentícia com o intuito de melhorar o aroma, o sabor e a textura dos alimentos. De todos os aditivos utilizados os corantes são os mais genotóxicos. Os corantes azóicos, derivados do petróleo, utilizados pelas indústrias, são o tartrazina e vermelho 40. O teste SMART de asa foi utilizado para verificar os possíveis efeitos genotóxicos destes corantes em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Para esta avaliação foram utilizadas larvas de 48 horas, descendentes do cruzamento padrão (ST) e alta bioativação (HB) que foram tratadas com tartrazina nas concentrações 1,5, 2,5 e 3,0 mg/mL e 5, 10 e 20 mg/mL para o vermelho 40. Os resultados mostraram aumento significativo de manchas nos descendentes ST para tartrazina e HB para o vermelho 40. Concluímos que os corantes artificiais tartrazina e vermelho 40 são genotóxicos nas doses utilizadas para o estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Tartrazina, Vermelho 40, *Drosophila melanogaster*, SMART, doxorubicina, uretano.

Abstract

Food additives are used by the food industry in order to enhance the aroma, flavor and texture of foods. Of all the additives used colors are the most genotoxic. The azo dyes, derived from oil, used by industries, are the tartrazine and red #40. The SMART wing test was used to verify the possible genotoxic effects of colors in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. For this evaluation were used larvae of 48 hours, descendants of the Standard Cross (ST) and High Bioactivation (HB) that who were treated with tartrazine in concentrations 1.5, 2.5 and 3.0 mg / mL and 5, 10 and 20 mg / mL for the red #40. The results showed significant increase of spots in the ST descendants for tartrazine and HB for the red #40. We concluded that the artificial colors tartrazine and red #40 are genotoxic in the doses used for the study.

Keywords: Tartrazine, Red # 40, *Drosophila melanogaster* SMART, doxorubicin, urethane.

1. Introdução

A modernização da indústria alimentícia trouxe consigo o aumento do uso de aditivos alimentares. A aceitação do produto alimentício pelo consumidor está diretamente relacionada a sua cor. Esta característica sensorial, embora subjetiva, é fundamental na indução da sensação global resultante de outras características como o aroma, o sabor e a textura dos alimentos. (Collins e Plumbly, 1995; Freund et al., 1988 input Constant et al., 2002).

Os corantes artificiais têm maior poder de fixação do que os naturais, propiciando cores mais intensas, aumentando o número de tonalidade, com maior estabilidade e menor custo (Calil e Aguiar, 1999).

De todos os aditivos usados em alimentos, os corantes são os mais genotóxicos (Sasaki et al., 2002).

Os corantes artificiais permitidos no Brasil são o amarelo crepúsculo, azul brilhante FCF, bordeaux S ou amaranto, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina e o vermelho 40 (Damasceno, 1988).

Alguns fabricantes garantem que os corantes não trazem nenhum prejuízo à saúde humana. O mesmo não se pode dizer da maior parte dos corantes artificiais, os corantes azóicos (produzidos a partir de derivados de petróleo), que não são seguros à saúde humana (Calil e Aguiar, 1999).

O corante artificial tartrazina (CI No 19140) é um dos mais usados para corar alimentos (Arden e Ram, 2001), medicamentos e cosméticos. É um derivado nitroso, sabidamente causador de reações alérgicas como asma e urticária (Bathia, 2000, Elhkim, et al., 2007) e é alvo de estudos de mutagênese e carcinogênese, por produzir a amina aromática ácido sulfanílico, após ser metabolizado pela microflora gastrintestinal (Moutinho; Bertges e Assis, 2007).

Estudo realizado por Moutinho; Bertges e Assis (2007) em 45 ratos Wistar, machos, recebendo diariamente tartrazina mostrou um aumento significativo do número de linfócitos e eosinófilos, porém não foram observadas alterações carcinogênicas.

A FAO (Food and Agriculture Organization) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) estabeleceram o consumo aceitável (ADI) em 7,5 mg/kg

para o corante tartrazina, e de 7,0 mg/kg para o vermelho 40 (Sasaki et al., 2002; Husain et al., 2006; Elhkim et al., 2007).

Estudo realizado por Sasaki et al. (2002) mostraram que os corantes Vermelho 40 (CI No 16035) e Tartrazina induziram dano no DNA em estômago, cólon e/ou bexiga urinária com dose de 10mg/kg para a tartrazina e 100 mg/kg para o vermelho 40. Estas doses são próximas as aceitáveis para o consumo pela ADIs.

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), descrito por Graf et al. (1984), é utilizado para detecção da atividade mutagênica e recombinogênica em *Drosophila melanogaster*. É um teste rápido, de fácil realização e baixo custo. Nele, as larvas trans heterozigotas são expostas aos componentes testes por períodos de tempo variados (Graf et al., 1984). Quando ocorre uma alteração genética, em uma das células que estão se dividindo por mitose, é formado um clone de células mutantes, que pode ser detectado fenotipicamente como uma mancha mutante na superfície das asas dos adultos. A análise das lesões induzidas é feita pela observação de grupos de células (clones mutantes), que expressam fenotipicamente os genes marcadores *flr3* ou *mwh*, responsáveis por mudanças na forma dos pêlos ou tricomas (Graf et al. 1984).

O etilcarbamato é um antineoplásico, também utilizado como anestésico veterinário. A doxorubicina é um antibiótico antracíclico produzido pelo fungo *Streptomyces peucelii* var. *caesius* utilizado como antineoplásico inibindo a ação da topoisomerase II. É utilizado no tratamento de várias neoplasias malignas, dentre elas o câncer de mama, ovário, leucemia, pulmão e testículo (Chiuchetta e Castro-Prado, 2002). Estes produtos foram utilizados como controles positivos para o teste.

O objetivo da pesquisa foi avaliar a genotoxicidade dos corantes artificiais amarelo tartrazina e vermelho 40 uma vez que estes corantes são utilizados em vários produtos alimentícios.

2. Material e Métodos

2.1. Agentes Químicos

O etilcarbamato (CAS 51-79-6), produzido pelo laboratório Fluka, Buchs, Switzerland, com peso molecular de 89,10, conhecido por uretano. Este agente químico foi cedido pelo Dr. Ulrich Graf do Institute of Toxicology ETH and University of Zurich, Schwerzenbach (Suíça). O cloridrato de Doxorrubicina (DXR – CAS 23214-92-8) sob a forma de pó liofilizado, produzido pelo Laboratório Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil. Corante amarelo tartrazina (CAS – 1934-21-0) (Figura 3) e vermelho 40 (CAS – 25956-17-6) (Figura 4), ambos doados por M. Cassab Comércio e Indústria Ltda. Todos os agentes foram diluídos em água destilada estéril no momento do uso, e os frascos com doxorrubicina foram revestidos com papel alumínio para evitar a fotodegradação dos seus constituintes.

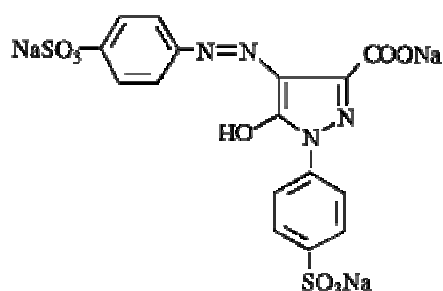


Figura 1: Corante Amarelo Tartrazina:

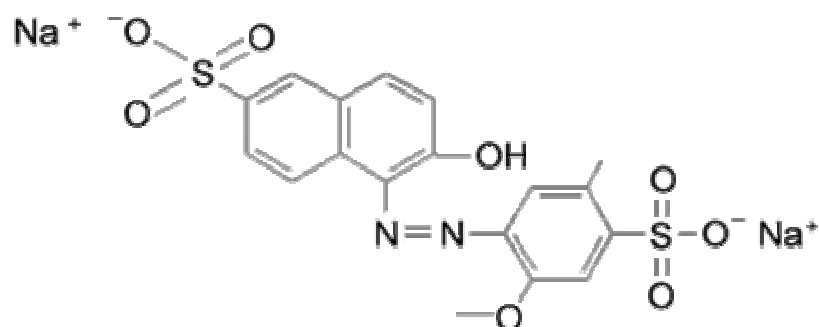


Figura 2: Corante Vermelho 40

2.2. Linhagens estoques

Foram realizados dois tipos de cruzamentos: Cruzamento padrão (ST – “Standard Cross”) no qual fêmeas virgens da linhagem *flare*³ (*flr*³/*In*(3LR)*TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^s) foram cruzadas com machos *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) (Graf, et al., 1989); Cruzamento de alta bioativação (HB – “High Bioactivation Cross”), no qual fêmeas virgens de linhagem *ORR – flare*³ (*ORR/ORR, FLR*³/*In*(3LR)*TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^s), foram cruzados com machos *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) (Graf e Singer, 1992). Destes cruzamentos nasceram dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, devido ao marcador *TM3, Bd*^s. O MH (*mwh +/+ flr*³) apresenta os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que o BH (*mwh +/+ TM3, Bd*^s) apresenta um cromossomo com múltiplas inversões (*TM3, Bd*^s). O fenótipo do descendente trans-heterozigoto marcado é uma asa normal, com borda lisa, enquanto que no heterozigoto balanceado, as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas “serrate”. (Guzmán-Rincón e Graf, 1995)

Nos descendentes heterozigotos marcados (MH), os eventos mutacionais e recombinacionais levam à formação de manchas simples ou gêmeas nas asas de *Drosophila melanogaster* adultas. Já nos descendentes BH, todos os eventos recombinogênicos são eliminados. Devido à inversão múltipla do balanceador gênico, apenas eventos mutacionais podem elevar o número de manchas simples (Graf e Singer, 1992). Manchas simples (fenótipo com pêlos *mwh* ou *flr*³) são produzidas por mutação de ponto, deleção, e recombinação (crossing-over mitótico), enquanto que manchas gêmeas (mancha *mwh* adjacente à mancha *flr*³), são produzidas exclusivamente por recombinação mitótica. (Graf et al., 1984; Frei e Würgler, 1996)

2.3. Coleta de larvas

A ovoposição é realizada em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) suplementada de sacarose. As larvas de 3 dias de idade, já no 3^o

estágio de desenvolvimento embrionário, são lavadas em água destilada, e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina, de metal. Nesta fase, as larvas foram colocadas em frascos contendo 1,5 g de meio instantâneo (purê de batata instantâneo da marca Hikari®), ao qual adicionados 5 mL do componente teste, e submetidas ao tratamento crônico, no qual as larvas se alimentam aproximadamente por 48 horas, ou seja, pelo resto de seu desenvolvimento larval (Graf et al., 1984 e 1989).

2.4. Procedimento Experimental

Os experimentos foram realizados à temperatura média de 25° C e 65% de umidade relativa. O controle da temperatura é essencial em SMART de asa, pois afeta a frequência das manchas. Temperaturas mais altas (29,5° C) aumentam a expressão de manchas *mwh* drasticamente (Graf, 1986; Katz e Foley, 1993).

As larvas foram colocadas em frascos de vidro contendo 1,5g de meio de cultura alternativo e 5ml de solução aquosa dos corantes amarelo tartrazina e vermelho 40 nas seguintes concentrações: 1,5, 2,5 e 3,0 mg/mL para tartrazina e 5, 10 e 20 mg/mL para o vermelho 40. Como controle negativo em ambos os testes foi utilizada água destilada e para controle positivo foi utilizado a doxorrubicina (0,125 mg/mL), para o tratamento com o vermelho 40, e uretano (10 mM), para o tratamento com a tartrazina. Os testes foram envolvendo a DXR foram realizados na ausência de luz e os frascos foram envolvidos com papel alumínio para evitar a fotodegradação do produto.

As larvas foram expostas aos agentes por um período de, aproximadamente 48 horas (tratamento crônico), período o qual elas sobem às paredes dos frascos, passando para o estágio de pupa.

2.5. Preparação e Análise Microscópica das asas

Após a eclosão das pupas, as moscas adultas surgidas são coletadas e conservadas em etanol 70%. As asas das moscas são retiradas do etanol, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada) e estendidas sobre uma lâmina seca. Estas lâminas são secadas por 24 horas sobre placa aquecedora

($\pm 40^\circ \text{C}$). Após, são colocadas as lamínulas e sobre estas, um peso de $\pm 400 \text{ g}$ por mais de 48 horas (Graf et al., 1984).

As lâminas são analisadas em microscópio óptico de luz (400 X magnificação). São registrados o tamanho (número de células afetadas) e o tipo das manchas (simples *mwh* ou *flr*³ e manchas gêmeas) e a posição em que se encontram na asa (Graf et al., 1984).

O registro dessa frequência e tamanho de diferentes manchas permite a determinação quantitativamente dos efeitos mutagênicos e recombinogênicos.

2.6 Análise estatística

A análise estatística dos experimentos, para a verificação de uma possível ação genotóxica dos corantes artificiais tartrazina e vermelho 40 foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würigler (1988).

3. Resultados e discussão

As Tabelas 1 e 2 mostram as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e nos descendentes balanceador-heterozigoto, do cruzamento padrão (ST) e alta bioativação metabólica (HB). Pode-se observar que o quimioterápico doxorrubicina (DXR) e o uretano (URE) exerceram seu efeito genotóxico aumentando o número de manchas mutantes, em relação ao controle negativo, água. Este aumento é estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) em todas as classes de manchas.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das frequências de manchas mutantes, em ambos os descendentes, expostos ao corante amarelo tartrazina. Nos descendentes ST houve um aumento significativo ($\alpha = 0,05$) de manchas pequenas na concentração 2,5 mg/mL. Nos descendentes HB não houve aumento significativo de manchas, nos indivíduos expostos às três concentrações.

Os resultados obtidos mostram que a tartrazina possui ação direta, uma vez que houve aumento de manchas no cruzamento ST e não houve este aumento no cruzamento HB. A genotoxicidade da tartrazina foi também demonstrada por Tripathy et al. (1989) em *Drosophila melanogaster* e por Sasaki et al. (2002), em ratos, com doses próximas as recomendadas pela ADI's.

No estudo conduzido por Tripathy et al. (1989) a tartrazina não apresentou efeito genotóxico em larvas de 48 horas, porém a dose utilizada pelos autores (0,012 e 0,06 mg/ml) foi menor que a utilizada neste trabalho. Já em larvas de 72 horas obtiveram-se resultados positivos. Os autores concluíram que a tartrazina possui efeito genotóxico com ação direta após exposição prolongada ao composto.

Neste trabalho foram utilizadas doses maiores que a utilizada por Tripathy et al (1989) e a tartrazina mostrou efeito genotóxico nas larvas expostas ao composto por 48 horas.

No estudo realizado por Sasaki et al. (2002) ratos foram expostos a várias concentrações de tartrazina (1 a 2000 mg/kg) por dois períodos de tempo distintos (3 e 24 horas) e esta mostrou sua genotoxicidade a partir de 10 mg/kg independente do período de exposição ao produto.

Conclui-se, então, que a tartrazina possui efeito genotóxico e em baixas concentrações este efeito surge a partir de exposição prolongada ao produto.

A Tabela 2 mostra a frequência de manchas mutantes observados em ambos os cruzamentos, ST e HB nas moscas expostas ao vermelho 40. Nos descendentes do cruzamento ST não houve um aumento significativo ($\alpha = 0,05$) de manchas, nos indivíduos expostos as três concentrações.

No cruzamento HB houve aumento significativo de manchas pequenas nas concentrações de 10 e 20 mg/mL. Nas concentrações de 5 e 10 mg/mL este aumento correspondeu ao total de manchas.

Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas, que são principalmente as enzimas da super-família do citocromo P-450. Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno (Gregory, 1986).

As moscas obtidas do cruzamento HB possuem esta família de enzimas do citocromo P-450. Assim, através dos resultados obtidos conclui-se que o corante vermelho 40 não possui ação direta, uma vez que não houve aumento significativo de manchas no cruzamento padrão. Mas, ao ser biotransformado por este conjunto de enzimas torna-se um agente capaz de induzir a genotoxicidade nas doses estudadas.

Um dos compostos derivados da biotransformação do corante Laranja II é o 1-amino-2-naftol que induziu tumores na bexiga (Chung et al., 1978). A redução do vermelho 40 produz o 1-amino-2-naftol-6-ácido sulfanílico, esta amina aromática (Moutinho, Bertges e Assis, 2007) possui estrutura semelhante ao metabólito reativo obtido pelo corante Laranja II. Assim pode-se sugerir que este metabólito possa ser o responsável pela genotoxicidade, após a biotransformação do corante vermelho 40.

Os corantes azóicos são degradados por microorganismos e é possível que a toxicidade e/ ou os efeitos carcinogênicos podem ser devidos aos produtos degradados a partir dos corantes (Chung et al., 1978 e Dykes et al., 1994).

A carcinogenicidade dos corantes azóicos pode ser devido ao próprio corante, como foi mostrado através dos resultados obtidos com o corante tartrazina ou por aminas aromáticas geradas durante a biotransformação

redutiva das ligações dos corantes azóicos, que foi evidenciado pelos resultados com o corante vermelho 40. Nos mamíferos, os corantes azóicos são transformados em aminas aromáticas pelo citocromo P-450 e por uma redutase dependente de flavina (Chung, et al., 1978 e Gregory, 1986).

Foi realizada a análise dos descendentes balanceadores-heterozigotos (BH) o que evidenciou que tanto a tartrazina quanto o vermelho 40 não possui atividade recombinogênica. Estes dados são mostrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Podemos concluir que nas condições experimentais delineadas neste experimento, os corantes artificiais tartrazina e vermelho 40 apresentam atividades genotóxicas em *Drosophila melanogaster*. A tartrazina atua como agente genotóxico direto, não necessitando de ativação metabólica. O vermelho 40, por sua vez, atua como genotóxico indireto, necessitando de bioativação pelas enzimas citocromo P-450.

Tabela 1. Frequência de manchas mutantes, observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e alta bioativação (HB), tratados com corante artificial Tartrazina em três diferentes concentrações

Manchas por indivíduo (n°. de manchas) diag. estatístico ^a														
Tratamento	N. de moscas (N)	MSP (1-2 céls) ^b m = 2			MSG (>2 céls) ^b m = 5			MG m = 5			TM m = 2	Total de manchas mwh ^c (n)		
ST														
<i>mwh/flr³</i>														
Contr. Neg	20	0,45	(09)		0,05	(01)		0,00	(00)		0,50	(10)	10	
URE 10mM	20	2,60	(52)	+	0,05	(01)	i	0,10	(02)	i	2,75	(55)	+	55
Tartrazina 1,5 mg/mL	20	0,35	(07)	-	0,25	(05)	i	0,10	(02)	i	0,70	(14)	i	14
Tartrazina 2,5 mg/mL	20	1,00	(20)	+	0,05	(01)	i	0,00	(00)	i	1,05	(21)	+	21
Tartrazina 3,0 mg/mL	20	0,65	(13)	i	0,10	(02)	i	0,00	(00)	i	0,75	(15)	i	15
<i>mwh/TM3</i>														
Contr. Neg	10	0,40	(04)		0,00	(00)		^d			0,40	(04)		4
URE 10mM	20	1,05	(21)	+	0,00	(00)	i				1,05	(21)	+	21
Tartrazina 2,5mg/mL	20	0,50	(10)	i	0,05	(01)	i				0,55	(11)	i	11
HB														
<i>mwh/flr³</i>														
Contr. Neg	20	1,10	(22)		0,20	(04)		0,00	(00)		1,30	(26)		26
URE 10mM	20	5,35	(107)	+	1,70	(34)	+	0,45	(09)	+	7,50	(150)	+	148
Tartrazina 1,5 mg/mL	20	0,85	(17)	-	0,05	(01)	-	0,05	(01)	i	0,95	(19)	-	19
Tartrazina 2,5 mg/mL	20	0,15	(03)	-	0,00	(00)	-	0,10	(02)	i	0,25	(05)	-	5
Tartrazina 3,0 mg/mL	20	0,85	(17)	-	0,05	(01)	-	0,00	(00)	i	0,90	(18)	-	18

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. M, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 2. Frequência de manchas mutantes, observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e alta bioativação (HB), tratados com corante artificial Vermelho 40 em três diferentes concentrações

Tratamento	Manchas por indivíduo (n.º. de manchas) diag. estatístico ^a										
	N. de moscas (1-2 céls) ^b	MSP		MSG		MG		TM		Total de manchas mwh ^c (n)	
	(N)	m = 2		(>2 céls) ^b m = 5		m = 5		m = 2			
<i>mwh/flr</i> ³											
ST											
Contr. Neg	31	0,65	(20)	0,03	(01)	0,00	(00)	0,68	(21)	21	
DXR 0,125 mg/mL	25	3,76	(94)	+	3,60 (90)	+	3,64 (91)	+	11,00 (275)	+	268
VER 40 5 mg/mL	22	0,50	(11)	i	0,14 (03)	i	0,00 (00)	i	0,64 (14)	-	13
VER 40 10 mg/mL	17	0,88	(15)	-	0,06 (01)	i	0,00 (00)	i	0,94 (16)	i	16
VER 40 20 mg/mL	9	1,00	(09)	i	0,11 (01)	i	0,00 (00)	i	1,11 (10)	i	10
HB											
Contr. Neg	18	0,67	(12)	0,11	(02)	0,00	(00)	0,78	(14)	14	
DXR 0,125 mg/mL	17	4,35	(74)	+	1,53 (26)	+	2,41 (41)	+	8,29 (141)	+	139
VER 40 5 mg/mL	12	1,25	(15)	i	0,25 (03)	i	0,00 (00)	i	1,50 (18)	+	18
VER 40 10 mg/mL	20	1,50	(30)	+	0,05 (01)	i	0,05 (01)	i	1,60 (32)	+	32
VER 40 20 mg/mL	21	1,29	(27)	+	0,05 (01)	i	0,00 (00)	i	1,33 (28)	i	28
<i>mwh/TM3</i>											
Contr. Neg	10	0,40	(04)	0,00	(00)		^d	0,40	(04)	4	
DXR 0,125 mg/mL	18	0,61	(11)	i	0,00 (00)	i		0,61	(11)	i	11
VER 40 5 mg/mL	18	0,17	(03)	-	0,00 (00)	i		0,17	(03)	-	3
VER 40 10 mg/mL	20	0,35	(07)	i	0,00 (00)	i		0,35	(07)	i	7

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *M*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³.

4. Referências Bibliográficas

Arden KD; Ram FS. 2001 Tatrazine exclusion for allergic asthma. Cochrane Database Syst Ver; (4):CD000460.

Bhatia MS. 2000. Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. J Clin Psychiatry; 61(7):473-6, Jul.

Calil RM; Aguiar JA. 1999. Aditivos nos alimentos. Câmara Brasileira do Livro. São Paulo.

Chiuchetta e Castro-Prado. 2002. Doxorubicin and etoposide induce somatic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. Braz. J. Microbiol. Vol33 no.3 São Paulo July/Sept.

Chung, K; Fulk, G; Egan, M. 1978. Reduction of Azo Dyes by Intestinal Anaerobes. Applied and Environmental Microbiology. V.35, n.3. p.558-562.

Collins, P.; Plumbly, J. 1995. Natural colors: stable future? Food Tech Europe, v.49, n.2, p.64-70.

Damasceno, V. 1988. Guerra dos corantes sintéticos ressuscita os naturais. Química e Derivados, v. 24, n. 250, p.10-21.

Dykes, GA, Timm, RG, Von Holy, A. 1994. Azoreductase activity in bacteria associated with greening of instant chocolate puddings. Applied and Environmental Microbiology. Aug. p. 3027-3029.

Elhkim MO; Héraud F; Bemrah N; Gauchard F; Lorino T; Lambré C; Frémy JM; Poul JM. 2007. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine An update toxicological assessment, intolerance reactions and

maximum theoretical daily intake in France. Regul Toxicol Pharmacol;47(3):308-16.

Frei H., Würgler F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutat Res 203:297-308, 1988.

Frei H, Würgler FE. 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutagenesis 11:315-325.

Freund, P.R.; Washan, C.J.; Maggion, M. Natural color for use in foods. Cereal Foods World, v.33, n.7, p.553-559, 1988. in put Constant, PBL; Stringheta, PC; Sandi, D. 2002. B.CEPPA, Curitiba, v. 20, n. 2, jul./dez. 2002 B.CEPPA, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul./dez. 2002

Graf U, Singer D. 1992. Genotoxicidade testing of promutagens in the wing Somatic Mutations and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Ver Int Contam Ambient 8(1):15-27.

Graf U, Würgler FE, Katz AI, Frei H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Env Mol Mutagen 6:153-188.

Graf U. 1986. Temperature effect on mwh expression in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Research Notes SFIT and University of Zurich, SS. DIS, pp.63-65.

Graf U, Frei AK, Katz AJ, Würgler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutat Res 222:359-373.

Gregory, P. 1986 Azo dyes: Structure Carcinogenicity Relationships. Dyesand

Pigments. Applied Science Publishers, n.7, p.45-56 .

Guzmán-Rincón J, Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change. Plenum Press New York, pp. 169-181.

Husain A; Sawaya W; Al-Omair A; Al-Zenki S; Al-Amiri H; Ahmed N; Al-Sinan M. 2006. Estimates of dietary exposure of children to artificial food colours in Kuwait. Food Addit Contam;23(3):245-51, 2006 Mar.

Katz AJ, Foley TA. 1993. Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spot assay. Env Mol Mutagen 22:54-58.

Moutinho, I. L. D; Bertges, L. C; Assis, R. V. C. 2007. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow nº 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. Braz. j. biol;67(1):141-145, Feb.

Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita A, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mutat Res. Aug 519:103-19.

Tripathy, NK, Patnaik, KK, Nabi, MdJ. 1989. Genotoxicity of tartrazine studied in two assays of *Drosophila melanogaster*. Mutation Research; 224: 479-483