



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JASSANA MOREIRA FLORIANO

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *EX VIVO* EM LEUCÓCITOS HUMANOS DO CORANTE  
TARTRAZINA: DA CITOTOXICIDADE À GENOTOXICIDADE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA, RS

2018

**JASSANA MOREIRA FLORIANO**

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *EX VIVO* EM LEUCÓCITOS HUMANOS DO CORANTE  
TARTRAZINA: DA CITOTOXICIDADE À GENOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

URUGUAIANA  
2018

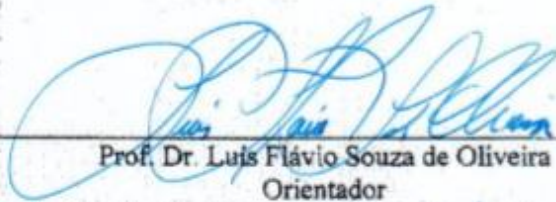
**JASSANA MOREIRA FLORIANO**

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *EX VIVO* EM LEUCÓCITOS HUMANOS DO CORANTE  
TARTRAZINA: DA CITOTOXICIDADE À GENOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

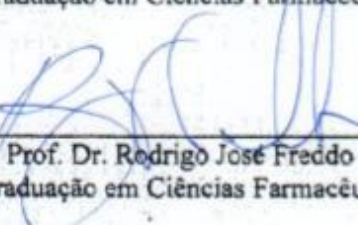
Dissertação defendida e aprovada em: 16 de Março 2018

Banca examinadora:



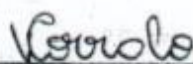
Prof. Dr. Luis Flávio Souza de Oliveira  
Orientador

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA



Prof. Dr. Rodrigo José Freddo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA



Prof. Dr. Vanessa Corralo

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - UNOCHAPECÓ

## AGRADECIMENTOS

### **Agradeço...**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, pela oportunidade da realização desse sonho!

Ao meu Caro Orientador Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira, que desenvolveu com maestria a atribuição de orientar e ensinar. Sendo um facilitador e apoiador em todos os momentos. Ao mestre, minha eterna gratidão e admiração!

A todo o Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, em especial, Prof. Dr. Michel Machado e as colegas (hoje Mestres) Emanoeli Rosa, Queila Amaral e Taís Kaminski, pela aprendizagem e contribuições, além de não pouparem empenho e dedicação na construção desta pesquisa.

Aos professores Dr. Rodrigo Freddo e Dra. Vanessa Corralo, que se mostraram dispostos a contribuir desde o princípio de criação deste trabalho.

Aos meus pais, Solanis e Vadair, que são meus maiores ídolos e incentivadores. Sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. À ambos devo eternamente esta conquista, a determinação e luta na minha formação.

À minha irmã, Paola Floriano, por estar presente desde os primórdios (da minha vida), fornecendo apoio, companhia e abrigo.

Aos meus companheiros de disciplinas Diego Suevo e Tamara Maciel, agradeço pela parceria e por estarem sempre prontos a ajudar. Vocês fazem parte da minha jornada!

À amiga Adriane Feijó, fiel conselheira, sempre compartilhando seu conhecimento e auxiliando no que fosse possível.

Ao amigo Alisson Oliveira pela contribuição valiosa, paciência e confiança a mim concedida durante todo esse período de aprendizado.

Ao meu querido Julio Lermen, por sempre demonstrar apoio e despender palavras de incentivo.

À Secretaria Municipal de Educação de Pontão – RS, meu local de trabalho, especialmente à Maria Elena Souza, Eloisa Hammel e Andrea Giroletti, que me apoiaram, auxiliaram e compreenderam meu distanciamento dedicado aos estudos.

A todos mencionados e aqueles que direta ou indiretamente participaram dessa jornada, presto meus sinceros agradecimentos. Todos foram peças fundamentais para que a execução deste trabalho fosse possível.

**Muito Obrigada!**

*A ostra, para fazer uma pérola, precisa ter dentro de si um grão de areia que a faça sofrer. Sofrendo, a ostra diz para si mesma: - Preciso envolver essa areia pontuda que me machuca com uma esfera lisa que lhe tire as pontas. OSTRAS FELIZES NÃO FAZEM PÉROLAS...*

Rubem Alves

## RESUMO

O uso de corantes alimentares está presente nos registros históricos da civilização. Utilizados inicialmente como especiarias e condimentos, grande parte foi substituída por corantes artificiais, que ganharam outras aplicações. A Tartrazina (TRZ) é um corante que confere a cor amarelo-limão aos alimentos, amplamente utilizada na fabricação de inúmeros produtos alimentícios, além de produtos farmacêuticos e cosméticos. Contudo, existem poucos estudos voltados à toxicologia da TRZ em células ou tecidos humanos. Assim, considerando o frequente consumo do corante TRZ em produtos alimentícios e a lacuna de dados toxicológicos, objetivou-se neste trabalho avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade do corante TRZ em cultura de leucócitos humanos, bem como estudos teóricos preditivos de toxicidade *in silico*. As culturas de leucócitos foram preparadas nas concentrações de 5, 17,5, 35, 70, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL de TRZ. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A mutagenicidade foi avaliada através do teste de micronúcleos, do índice de divisão nuclear, do índice de citotoxicidade de divisão nuclear e quantificação da instabilidade cromossômica pela Citogenética da Banda G. A genotoxicidade foi avaliada através do teste Cometa Alcalino. A citotoxicidade foi avaliada através da análise de viabilidade celular utilizando o método do Azul de Tripam. Os dados estatísticos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) seguida de teste Post-Hoc de Tukey, admitindo valor de  $p < 0,05$ . Não foram encontrados resultados de mutagenicidade e citotoxicidade para o corante nas concentrações avaliadas. No entanto, foi observado dano de DNA a partir da concentração de 70 µg/mL de TRZ. Tais resultados foram confirmados pelos dados preditivos das avaliações *in silico*. Outros estudos são necessários para a complementariedade dos dados, considerando a frequência de utilização da TRZ na alimentação da população, incluindo crianças, bem como a exposição a fármacos, cosméticos e demais produtos não alimentícios.

**Palavras-chave:** Aditivo Alimentar, Azocorante, Toxicidade *in silico*, toxicologia

## ABSTRACT

The use of food colorings has a long recorded history. Tartrazine (TRZ) is a dye that confers a lemon-yellow color to food and is widely used in the manufacture of numerous food products, as well as in pharmaceuticals and cosmetics. However, few studies have addressed the toxicology of TRZ in human cells or tissues. Considering the frequent consumption of the TRZ dye in food products and the lack of toxicological data, the present study aimed to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of the TRZ dye in human leukocyte cultures and perform theoretical studies to predict its toxicity *in silico*. Leukocyte cultures were treated with TRZ at concentrations of 5, 17.5, 35, 70, 100, 200, 300, 400, and 500 µg/mL. All groups were assayed in triplicates. The mutagenicity was evaluated using the micronucleus test, the nuclear division index, and the nuclear division cytotoxicity index, and the chromosomal instability was quantitatively evaluated by band cytogenetics. Genotoxicity was evaluated using the alkaline comet test. Viability was assessed using the Trypan Blue method. Statistical analyses were performed using analysis of variance followed by Tukey's post hoc test, with a p value <0.05 reflecting statistical significance. No mutagenicity or cytotoxicity was found for the dye at the concentrations evaluated. However, DNA damage was induced by TRZ at a concentration of 70 µg/mL, which reaches the plasma peak concentration range. These results were confirmed by the predictive data from the *in silico* evaluations. Further studies are required to confirm our data, considering the frequency of the use of TRZ in the diet of the population, including that of children, as well as the exposure to TRZ through drugs, cosmetics, and other non-food products.

**Keywords:** Food Additive, Azodye, Toxicity *in silico*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**FIGURA 1:** Porcentagem de uso de corantes, no mundo, pelas indústrias de alimentos e bebidas (DOWNHAM & COLLINS, 2000 adaptado por RODRIGUES, 2015).....18

**FIGURA 2:** Estrutura química do corante amarelo tartrazina.....21

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES – ARTIGO CIENTÍFICO:

**FIGURE 1.** Bioactivity parameter assessment model *in silico* by *Molinspiration Cheminformatics* 2017 program.....25

**FIGURE 2.** Evaluation of the Mechanisms of action parameter *in silico* model by the program *Molinspiration Cheminformatics* 2017.....26

**FIGURE 3.** Evaluation of kinetic parameters, molecule property and TRZ dye toxicity through pKCSM 2015 software.....27

**FIGURE 4.** Cell viability test in human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ;  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; CN = negative control; CP = positive control.....28

**FIGURE 5.** Index of DNA damage generated by the alkaline comet assay in human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ;  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; CN = negative control; CP = positive control.....29

**FIGURE 6.** Micronucleus counting in culture of human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; CN = negative control; CP = positive control.....31

**FIGURE 7.** Numerical chromosomal instability assay in human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ;  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; CN = negative control; CP = positive control.....32

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Classificação quanto à nomenclatura, métodos de obtenção e características dos diferentes tipos de corantes permitidos para utilização, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1977).....	18
--	----

### LISTA DE TABELAS – ARTIGOS CIENTÍFICOS:

<b>Table 1.</b> Descriptive summary of the predictive evaluation of TRZ through each software used in predictive computational toxicological analyzes.....	27
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å<sup>2</sup> – ångström

ANOVA – análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CN – controle negativo

CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

CP – controle positivo

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EFSA – European Food Safety Authority

FAO – Food and Agriculture Organization

FDA – Food and Drug Administration

g – gramas

GPCR - G protein-coupled receptors

H – Hidrogênio

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INS – International Numbering System

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

kg – Quilograma

mA – miliampère

mg – miligramas

min – minutos

mL – mililitros

mM – milimol

MN – micronúcleo

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPM – Rotação por Minuto

SO<sub>2</sub> – Dióxido de enxofre

TRZ – Tartrazina

US\$ - Dólares

V – volts

WHO – World Health Organization

µg – microgramas

µM – micromol

µL – microlitros

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. Objetivo Geral .....	15
1.2. Objetivos Específicos .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Histórico .....	16
2.2. Corantes Artificiais.....	17
2.2.1. Classificação.....	17
2.3. Regulamentação .....	19
2.4. Tartrazina.....	20
2.4.1. Testes Toxicológicos .....	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO – Toxicology Research .....	24
IS TARTRAZINE REALLY SAFE? <i>IN SILICO</i> AND <i>EX VIVO</i> TOXICOLOGICAL STUDIES IN HUMAN LEUKOCYTES: A QUESTION OF DOSE.....	24
3.1 INTRODUCTION .....	24
3.2 MATERIAL AND METHODS.....	24
3.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	26
3.4 CONCLUSION .....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
4. DISCUSSÃO GERAL.....	37
5. CONCLUSÃO.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	39
ANEXO 1. Normas para formatação - Toxicology Research .....	44

## 1. INTRODUÇÃO

A ampliação da produção alimentar tem garantido disponibilidade e variedade de alimentos, além da obtenção de novos produtos com atrativos diversos em termos de sabores, cores e enriquecimento de nutrientes (CAMPOS, 2014; FERREIRA, 2015).

Não obstante, a substituição dos alimentos de fabricação caseira por alimentos industrializados tem aumentado gradativa e significativamente nos últimos anos e, de acordo com a estimativa da indústria de alimentos, já no ano de 2005, aproximadamente 90% dos alimentos consumidos no mundo, eram de origem industrial. Na composição desses alimentos, estão inclusos os aditivos, no qual figuram os aromatizantes, flavorizantes, antioxidantes, estabilizantes, espessantes, edulcorantes, umectantes, acidulantes e os corantes. O uso desses aditivos pela indústria é justificado pela estabilidade conferida ao produto, pelas características organolépticas apresentadas e, sobretudo, pelo preço quando comparado ao produto natural (CAMPOS, 2014).

No Brasil, elaborações e publicações da legislação que dispõem sobre o uso de aditivos competem à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que, por sua vez, define os aditivos como qualquer substância intencionalmente adicionada aos alimentos sem o desígnio de nutrir, objetivando modificar as características dos alimentos e aumentar sua vida útil (BRASIL, 1997; FERREIRA, 2015).

A avaliação da utilização dos aditivos alimentares no âmbito mundial é respaldada pelo controle da Ingestão Diária Aceitável (IDA), desenvolvida pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA). No Brasil, a ANVISA, com a finalidade de minimizar os riscos à saúde humana, estabelece limites máximos permitidos dos aditivos para as diferentes categorias de alimentos. Contudo, o uso de aditivos em alimentos acaba por provocar uma série de dúvidas. Outro fato a ser considerado é que, na rotulagem dos alimentos industrializados, deve haver somente a relação dos aditivos utilizados. No entanto, na maioria dos casos, não existe obrigação legal em declarar as quantidades adicionadas destes aditivos no alimento, não sendo possível a verificação do consumidor quanto a IDA estabelecida (SCHUMANN, POLÔNIO & GONCALVES, 2008; RODRIGUES, 2015).

Ao definir as características apresentadas pelos alimentos, a coloração é um atributo muito importante, pois, usualmente, os consumidores associam a cor à qualidade do produto alimentar. As indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas utilizam amplamente corantes

a fim de conferir, restaurar ou intensificar a cor e garantir a padronização dos produtos (BRASIL, 1978). De todos os aditivos atualmente utilizados, a classe dos corantes é a que apresenta maiores efeitos genotóxicos (HONORATO et al., 2013).

É evidente a importância dos aditivos sob o ponto de vista tecnológico na produção de alimentos. Porém, é necessário estar atento aos possíveis riscos toxicológicos que podem ser acarretados pela ingestão frequente e acumulativa dessas substâncias. Esse fato tem gerado questionamentos e preocupações quanto à segurança do emprego de aditivos alimentares (DALL'AGNOL et al., 2013; POLÔNIO & PERES, 2009; POLÔNIO, 2010; FERREIRA, 2015).

Estudos têm demonstrado reações tóxicas sucedidas pelos aditivos, sejam agudas ou crônicas, que desencadearam processos alérgicos, alterações neurocomportamentais e, em longo prazo, neoplasias (DI LORENZO et al., 2002; MOUTINHO, BERTGES & ASSIS, 2007; GUIMARÃES, 2010). Desta forma, convém observar que as crianças apresentam maior suscetibilidade às reações provocadas pelos aditivos alimentares quando comparadas aos adultos. Isso ocorre ao considerar a quantidade ingerida, em relação à massa corporal, ser maior na criança. Além disso, dependendo da idade, apresentam imaturidade fisiológica, não sendo capazes de metabolizar nem excretar essas substâncias adequadamente, ocasionando, assim, o desencadeamento das reações adversas (SCHUMANN, POLÔNIO & GONÇALVES, 2008; POLÔNIO & PERES, 2009; POLÔNIO, 2010).

Esses dados geram preocupações porque muitas vezes o *marketing* de produtos industrializados é voltado para a população infantil, que se torna um grupo vulnerável mediante aos numerosos produtos ricos em aditivos presentes no mercado. Além disso, a utilização de corantes na indústria farmacêutica e cosmética amplia a frequência e formas de contato, expandindo ao desencadeamento de processos toxicológico (POLÔNIO, 2010; MORAES et al., 2015).

Adicionalmente, os estudos mutagênicos e carcinogênicos realizados não dão conta de uma prospecção mais aproximada da realidade de exposição de humanos, uma vez que seus ensaios foram realizados em animais, tampouco esgotaram a lacuna existente sobre a concentração mínima de dano mutagênico e carcinogênico (MOUTINHO, BERTGES & ASSIS, 2007; NINNI, 2015)

Muitos estudos tentam comprovar as reações adversas que os corantes artificiais podem causar à saúde. Apesar destes apresentarem os corantes artificiais como possíveis causadores de males à saúde, ainda existem poucos estudos e muitas contradições. Contudo, o monitoramento dos teores de corantes artificiais em alimentos tem, continuamente, contribuído para alertar para um consumo consciente desses produtos alimentícios (PRADO & GODOY, 2003; NINNI, 2015). Assim, a necessidade de explorar dados relacionados a esses compostos, a fim de confirmar a sua segurança na utilização de alimentos.

## **OBJETIVOS**

### **1.1.Objetivo Geral**

Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade do corante tartrazina em cultura de leucócitos humanos e em análises *in silico*.

### **1.2.Objetivos Específicos**

- Estudar a toxicologia preditiva computacional da tartrazina através dos *softwares Molinspiration Cheminformatics, ADMET, LAZAR Toxicology Prediction 1.3 e pkCSM*.
- Determinar os efeitos do corante tartrazina sobre parâmetros citotóxicos em culturas de leucócitos humanos, através do teste de viabilidade;
- Determinar a toxicidade do corante tartrazina sobre o DNA de leucócitos humanos, através do teste de dano oxidativo alcalino ao DNA;
- Determinar os efeitos do corante tartrazina sobre parâmetros mutagênicos em culturas de leucócitos humanos, através do teste de micronúcleo, índice de divisão nuclear, índice de citotoxicidade de divisão nuclear e quantificação da instabilidade cromossômica;
- Determinar a concentração mínima do corante tartrazina capaz de induzir danos genotóxicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.Histórico

A utilização dos corantes vem sendo empregada pelo homem desde a antiguidade, inicialmente para conferir cor a tecidos, cerâmicas e couros. Historicamente, a prática de tingir tecidos surgiu na Índia e se estendeu à Pérsia, Fenícia e Egito, onde, além dos tecidos, eram tingidos também vidros e cerâmicas (MENDA et al., 2011).

Já nos alimentos, eram usadas especiarias e condimentos a fim de colorir e os tornar mais atraentes. Porém, com o avanço da indústria alimentícia, grande parte dos corantes naturais (extraído de substância vegetal ou animal) foi substituída por corantes artificiais na produção de produtos industrializados (MORAES et al., 2015).

Os corantes sintéticos foram desenvolvidos, inicialmente, por Willian Henry Perkin, começando a ser usados no ano de 1856 (PETRIN, 2015). A indústria de corantes possibilitou a criação de outros segmentos que viriam a compor outros produtos, como antimicrobianos, explosivos, perfumes, tintas diversas, pesticidas e plásticos, ganhando força na Alemanha a partir de três companhias fundadas na década de 1860. Naquela década, essas companhias respondiam por uma pequena porcentagem dos corantes sintéticos produzidos no mundo, mas por volta de 1881, já eram responsáveis por metade da produção mundial. Na virada do século XX a Alemanha já havia conquistado quase 90% do mercado de corantes (MENDA et al., 2011).

Desde então, esses aditivos têm sido amplamente utilizados na criação de novos produtos no setor da indústria alimentar, com o intuito de melhorar aparência, intensificar ou restaurar a cor dos produtos alimentícios (SCHUMAN, POLÔNIO & GONÇALVES, 2008; MORAES et al., 2015).

Juntamente com o desenvolvimento desses produtos, também avançam na área científica os estudos quanto ao consumo excessivo de corantes e a avaliação de seus possíveis efeitos ao organismo humano. Por isso, são necessários estudos que analisem os aditivos, pois não se dispõe, até o momento na literatura científica, garantias de serem verdadeiramente inócuos na frequência de utilização e concentrações consumidas por humanos.

## **2.2. Corantes Artificiais**

Instintivamente, o ser humano tende a ser atraído por alimentos e bebidas que ostentem cores agradáveis. Diversas pesquisas identificaram que a cor do produto produz efeitos na percepção de qualidade do consumidor (DOWNHAM & COLLINS, 2000; ASHFAQ & MASUD, 2002; RODRIGUES, 2015; MARTINS, 2015).

O cozimento e processamento dos alimentos alteram a estrutura dos pigmentos dos alimentos, que resulta na mudança ou perda de cor destes. Os corantes, então, são utilizados para restaurar a cor e, portanto, manter ou melhorar o aspecto agradável (MARTINS, 2015).

De modo geral, a indústria alimentar apresenta maior utilização de corantes artificiais quando comparado aos corantes naturais. Em contrapartida, o uso dessas substâncias traz significativas preocupações de saúde. Ao longo do século, os corantes alimentares foram considerados substâncias que conferem maiores riscos à saúde do que qualquer outra categoria de aditivos alimentares (KOBYLEWSKI & JACOBSON, 2012).

Por outro lado, a capacidade de coloração dos corantes artificiais é superior à da maior parte dos obtidos de produtos naturais, o que justifica sua ampla utilização. Além disso, são mais estáveis, produzem cores mais uniformes e se misturam facilmente uns com os outros para dar uma grande variedade de tonalidades. Normalmente esses corantes não contêm sabor desagradável, ao contrário de alguns naturais, que trazem características das matérias primas de origem (QUEIRÓS & RODRIGUES, 2001). A grande maioria dos corantes artificiais utilizados em alimentos pertence aos grupos químicos: azoicos, derivados do trifenilmetano e indigoides (MULTON, 2000; RODRIGUES, 2015).

### **2.2.1. Classificação**

Segundo as regulamentações descritas pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) nº 44 de 1977 (BRASIL, 1978), os corantes permitidos para utilização em alimentos e bebidas são classificados quanto à nomenclatura e métodos de obtenção, como descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação quanto à nomenclatura, métodos de obtenção e características dos diferentes tipos de corantes permitidos para utilização, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1978).

Corante	Características
<b>Corante orgânico natural</b>	Obtido a partir de vegetal, ou, eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.
<b>Corante orgânico sintético</b>	Obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado. Possui duas subclasses.  Corante artificial: É o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.  Corante idêntico ao natural: É o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
<b>Corante inorgânico</b>	Obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.
<b>Caramelo</b>	Corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
<b>Caramelo (processo amônia)</b>	Corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200 mg/kg.

Adaptado da Resolução CNNPA nº 44 de 1977.

Ainda não existem estimativas oficiais quanto ao tamanho exato do mercado de corantes alimentares. No entanto, ao considerar uma escala global, é possível definir um cálculo médio na ordem de US\$ 940 milhões (DOWNHAM & COLLINS, 2000), que pode ser segmentado, de acordo com a frequência de utilização das diferentes classes de corantes, pelas indústrias fabricantes de alimentos e bebidas, conforme Figura 1, com ênfase ao uso de corantes sintéticos.

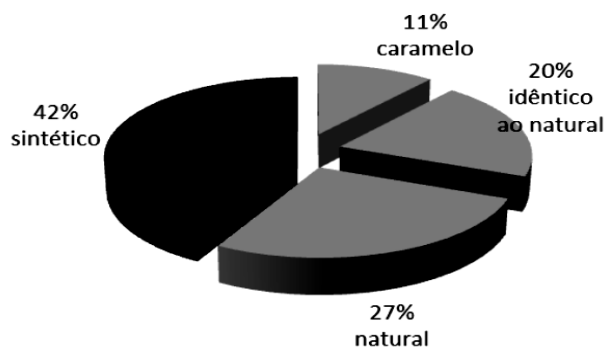


FIGURA 1: Porcentagem de uso de corantes, no mundo, pelas indústrias de alimentos e bebidas (fonte: DOWNHAM & COLLINS, 2000 adaptado por RODRIGUES, 2015).

De acordo com Marmitt, Pirottas e Stulp (2010), a estimativa de produção de tintas e pigmentos alimentares é de 750 a 800 mil toneladas por ano, dos quais 26 mil, em média, são consumidos apenas no Brasil (GOMES et al., 2013).

### **2.3.Regulamentação**

No início do século XX já podiam ser identificados mais de oitenta corantes sintéticos disponíveis para alimentos em todo o mundo, entretanto, não existiam quaisquer regulamentações quanto ao uso ou grau de pureza (QUEIRÓS & RODRIGUES, 2001; RODRIGUES 2015). Com a utilização cada vez maior desses aditivos, os países começaram a estabelecer legislações para controlar seu uso. Contudo, a lista dos permitidos em cada país varia substancialmente.

Assim, comitês internacionais, tais como a Comissão do Codex Alimentarius, organismo subsidiário da Food and Agriculture Organization (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), foram criados com o intuito de, entre outros objetivos, estabelecer especificações e critérios para a utilização de aditivos alimentares, incluindo os corantes sintéticos (QUEIRÓS & RODRIGUES, 2001; RODRIGUES, 2015).

Os aditivos alimentares usados mundialmente são identificados pelo Sistema Internacional de Numeração. Esta identificação foi elaborada pelo Comitê do *Codex Alimentarius* com o propósito de estabelecer um sistema numérico internacional de identificação pelo International Numbering System (INS) como alternativa à declaração do nome específico do aditivo (BRASIL, 2001; RODRIGUES, 2015).

No Brasil, a ANVISA é a responsável pela regulação e fiscalização de várias categorias de alimentos industrializados, aditivos e embalagens em contato com alimentos, criando inicialmente a Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997 (BRASIL, 1997), que aprova o regulamento técnico de aditivos alimentares, onde consta a definição, classificação e emprego destes, sendo a primeira legislação a ser harmonizada entre os países do Mercosul na área de aditivos alimentares.

Com a necessidade de regulação do uso de corantes pela indústria brasileira, foi elaborada pela ANVISA a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 45 (BRASIL, 2010a), que delimita os aditivos autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF) no Brasil e no Mercosul. Na mesma data, também foi aprovada a RDC nº 46 (BRASIL, 2010b),

que dispõe sobre os limites máximos atribuídos aos aditivos não listados na normatização anterior. No entanto, historicamente, a primeira legislação nacional sobre o assunto foi o Decreto nº 55871 (BRASIL, 1965), que exige que produtos alimentares que contenham corante artificial tragam no rótulo a frase “Colorido Artificialmente”, em vigor até os dias atuais. Ainda, quanto à rotulagem, a RDC nº 259 (BRASIL, 2002a) determina que os aditivos alimentares devem ser declarados com o seu nome completo ou seu número de INS, ou ambos, com exceção do corante tartrazina, que o nome deve ser declarado por extenso (BRASIL, 2002b).

A avaliação do uso de corantes como aditivos alimentares no âmbito mundial é direcionada pelo controle da IDA, que é estipulada com base em estudos toxicológicos e avaliação de risco feita pela FAO/WHO. Esse valor é uma estimativa da quantidade de aditivo alimentar, que pode ser ingerido diariamente por toda a vida, sem apreciável risco à saúde (BRASIL, 2012; RODRIGUES, 2015; MARTINS, 2015). A aplicação de tais estudos toxicológicos deve atender as especificações internacionais descritas pela FAO/WHO ou *Food Chemicals Codex*, e tratam-se de análises importantes que possam garantir a adição dos corantes aos alimentos (MARTINS, 2015).

#### **2.4. Tartrazina**

Tartrazina (INS 102), também chamado de Amarelo Tartrazina (TRZ), com nomenclatura oficial pela IUPAC de sal trissódico 5-hidroxi-1-(4-sulfonatofenil)-4-(4-sulfonato-fenilazo)-H-pirazol-3-carboxilato ( $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ ), é um corante alimentar que confere a cor amarelo-limão aos alimentos, além de ser utilizada em combinação a outros corantes para produzir tons de verde. Trata-se de um pigmento sintético pertencente ao grupo funcional dos azo-compostos (compostos orgânicos aromáticos que apresentam nitrogênio em sua estrutura química). A estrutura química da TRZ está representada na Figura 2 (JAIN, BHARGAVA & SHARMA, 2003).

Derivada do creosoto mineral, é sintetizada a partir da tinta do alcatrão de carvão, apresenta excelente estabilidade à luz e calor, possui o grupo  $SO_3Na^+$ , o que propicia sua solubilidade em água e facilita sua interação química com o produto a ser corado. A absorção máxima em solução aquosa é de  $427 \pm 2$  nm, descolorindo em presença de ácido ascórbico e  $SO_2$ . Usualmente descrita na forma de sal de sódio, sendo autorizados também os sais de potássio e de cálcio, pode ser encontrado sob a forma de granulados ou em pó de cor laranja clara (JAIN, BHARGAVA & SHARMA, 2003; LIDON & SILVESTRE, 2007).

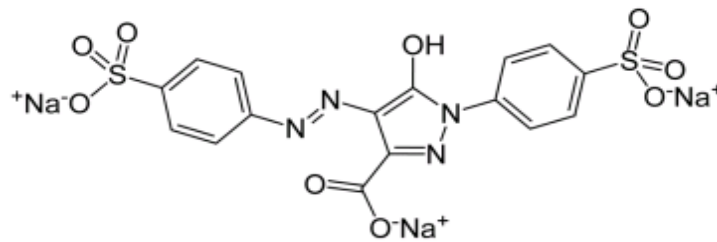


FIGURA 2: Estrutura química do corante amarelo tartrazina.

Sendo um corante artificial com uso amplamente difundido, o amarelo TRZ está presente na fabricação de inúmeros produtos de padaria, bebidas, laticínios, licores, pós para sobremesas e sucos, doces, cereais, gelatinas, alimentos para animais, entre outros alimentos. Em produtos farmacêuticos, como exemplo, citamos os medicamentos à base de Dipirona 500 mg (gotas) e Paracetamol (gotas) ambos de uso especialmente pediátrico, além de cosméticos (KOBYLEWSKI & JACOBSON, 2010; FREITAS, 2012; CAMPOS, 2014; RODRIGUES, 2015).

Na legislação brasileira, esse corante pode ser utilizado em concentrações de até 0,05 g/100g (ou g/100 mL) dependendo do tipo de alimento (BRASIL, 2011). Baseando-se em estudos realizados em diversos países e cumprindo exigências semelhantes às da *Food and Drug Administration* (FDA), no Brasil, a Resolução RDC nº. 340 determina que “as empresas fabricantes de alimentos que contenham em sua composição o corante tartrazina devem, obrigatoriamente, declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso” (BRASIL, 2002b).

A FAO/WHO (1997) indica que não sejam aplicados aditivos intencionalmente em alimentos designados a crianças menores de um ano, como rege o *Codex Alimentarius*, sendo cobertas por essas legislações as faixas para lactentes (de 0 a 12 meses incompletos) e crianças de primeira infância (1 a 3 anos). Para as demais faixas etárias há apenas a delimitação de IDA para as substâncias permitidas, fazendo com que as fases pré-escolares e escolares não tenham respaldo legislativo (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

Estes dados geram preocupações porque a população infantil se torna um grupo vulnerável mediante os numerosos produtos ricos em aditivos presentes no mercado e que são amplamente consumidos tanto por crianças como por adultos, o que os torna mais vulneráveis ao desencadeamento de processos toxicológico (POLÔNIO, 2010, MORAES et al., 2015).

### 2.4.1. Testes Toxicológicos

Ao comparar o corante TRZ aos demais corantes da classe química azo, identifica-se que a TRZ é capaz de induzir reações alérgicas mais severas, particularmente entre pacientes asmáticos e aqueles com intolerância à aspirina, a qual é percebida após a ingestão ou por exposição cutânea a substância que contenha TRZ (MICIC et al., 2014; RODRIGUES, 2015). A avaliação toxicológica da TRZ teve como enfoque a análise de risco pelo JECFA, que determinou a IDA de 7,5 mg/Kg de peso corpóreo para tartrazina (BRASIL, 2007).

Ao considerar todos os aditivos utilizados na indústria alimentícia, a classe dos corantes apresenta maior genotoxicidade (SASAKI et al., 2002). A tartrazina apresenta grande importância a estudos toxicologistas e alergistas, por estar relacionada a várias reações adversas, e por ter sido alvo de estudos de mutagênese e carcinogênese, já que, como todos os corantes azoicos, pode gerar amina aromática e o ácido sulfanílico após ser metabolizado pela microflora gastrointestinal. Mesmo assim, ainda é um dos corantes mais aplicados em alimentos, sendo permitido em países como Estados Unidos, Canadá, Brasil e União Européia (MOUTINHO, BERTGES & ASSIS, 2007; FREITAS, 2012).

Os efeitos do uso prolongado do corante amarelo TRZ na mucosa gástrica de ratos já foi investigado. Esses estudos demonstraram haver um aumento significativo na produção de linfócitos e eosinófilos na mucosa do antro gástrico. Não foram observadas alterações carcinogênicas em nenhuma das regiões gástricas com a dose e tempo utilizados (7,5 mg de tartrazina/kg/dia durante dez meses), respectivamente. Os autores sugerem estudos modificando-se a dose e tempo de exposição ao corante tartrazina, de forma a permitir a observação dos efeitos associados a outros carcinógenos (MOUTINHO, BERTGES & ASSIS, 2007, FREITAS, 2012).

Também já foi verificado que a TRZ produz neurotoxicidade e déficits de aprendizagem e memória em animais (GAO, 2011) em doses superiores à dose diária aceitável (0-7,5 mg/kg/dia). No entanto, não foi possível excluir que a exposição à TRZ, juntamente com outros corantes, exercesse toxicidade por mecanismos envolvendo processos sinérgicos. Outros estudos demonstraram que o corante possui potencial de atividade clastogênica, induzindo aberrações cromossômicas somáticas de hamster chinês (ISHIDATE et al., 1981, 1984) e rato (GIRI et al., 1990), mas não em camundongos (DURNEV et al., 1995).

A avaliação de consumo de aditivos, particularmente de corantes, como a TRZ, é uma tarefa difícil principalmente pelas informações escassas na literatura científica relacionadas a doses e concentrações tóxicas desse corante, principalmente em células humanas, bioacumulação, frequência/quantidade consumida diariamente, quantidade aplicada aos alimentos e demais produtos. Por isso, são necessárias pesquisas a fim de avaliar a exposição da população a este composto, presentes tanto na alimentação, medicação e cosméticos e identificar seus possíveis efeitos à saúde.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO – Toxicology Research

#### IS TARTRAZINE REALLY SAFE? *IN SILICO* AND *EX VIVO* TOXICOLOGICAL STUDIES IN HUMAN LEUKOCYTES: A QUESTION OF DOSE

##### 3.1 INTRODUCTION

Tartrazine (TRZ), an artificial dye that is widely used and synthesized from coal tar paint, is utilized in the manufacture of numerous food products as well as pharmaceuticals and cosmetics<sup>1,2</sup>. It is internationally identified by the INS 102 standard, yellow in color<sup>3,4</sup> and used as a low-cost alternative to saffron in cooking<sup>5</sup>. Although the level of consumption of these tar dyes is controlled based on the acceptable daily intake (ADI), there is insufficient information on how these additives affect food safety<sup>6</sup>.

In addition to this class of dyes presenting higher levels of genotoxicity than other additives<sup>7</sup>, the TRZ yellow dye appears to be a cause of severe allergic reactions<sup>8,9</sup> and has been the subject of toxicological and allergenic studies. Mutagenesis and carcinogenesis are among the targets of interest because, like all azo dyes, the metabolism of TRZ by the gastrointestinal microflora generates an aromatic amine and a sulfanilic acid. It is well established that aromatic amines are potential carcinogenic agents. Despite this, TRZ is still one of the most widely applied dyes in food, and its use is allowed in several countries<sup>10,11</sup>.

Although artificial colorants have been reported as potential causes of homeostatic disorders, there is a need for a more definitive clarification of the toxicity of TRZ, particularly its cytotoxicity and genotoxicity, as well as safe concentrations and doses used. In this context, there is a need for research evaluating the toxicology of TRZ. Thus, this study aimed to theoretically predict the toxicity of TRZ, as well as its cytotoxicity and genotoxicity in human leukocyte cultures, and establish the minimum concentration required to induce DNA damage.

##### 3.2 MATERIAL AND METHODS

This study was conducted at the Laboratory of Cell Toxicology of Unipampa, Uruguaiiana Campus, Brazil. Initially, *in silico* tests were conducted, involving experiments via computational simulation, with the aim of predicting the behavior of a given compound by selecting variables present in living organisms through specific mathematical applications established from a database associated with molecules; such tests were performed using different types of prediction software.

The biological matrix, human leukocytes, was maintained in the laboratory according to the protocol approved by the Research Ethics Committee (CEP) of Unipampa (approval number: 27045614.0.0000.5323). Leukocyte cultures were prepared using 0.5 mL of leukocyte ( $10^6$  leukocytes/mL) culture and immediately transferred to culture medium containing 10 mL of RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin, as described previously<sup>12</sup>. Cell culture flasks were heated at 37°C for 72 h in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The negative control contained 500 µL of phosphate-buffered

saline buffer (pH 7.4), and the positive control contained 4  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide for the cytotoxicity and alkaline comet tests and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bleomycin for the micronucleus test. For the test groups, 5, 17.5, 35, 70, 100, 200, 300, 400, and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TRZ was added, depending on the assay performed, calculated from the peak plasma concentration of TRZ (35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). All groups were assayed in triplicates.

Cytotoxicity analysis was performed using a viability test based on the loss of the integrity of the leukocyte membrane: The Trypan Blue dye exclusion method<sup>13</sup>. This method is based on the observation that viable cells are impermeable to the dye, whereas non-viable cells, due to the formation of pores in the membrane, are permeable to the dye and thus exhibit a blue color<sup>14</sup>. In this technique, samples from the leukocyte cultures (100  $\mu\text{L}$ ) were exposed to 0.2% Trypan Blue (100  $\mu\text{L}$ ), homogenized, and, after 3 min, an aliquot was placed in a Neubauer chamber and visualized under a microscope at a magnification of 400 $\times$  to calculate the cell viability. For this, 100 cells were enumerated per slide.

Genotoxicity was evaluated using the alkaline comet test<sup>15</sup>, in accordance with the guidelines for the use of comet assays<sup>16-18</sup>. After incubation, the samples (leukocytes) were homogenized with 0.75% low-melting-point agarose and added on 2.0% agarose-precoated microscope slides. The slides were immersed in a lysis solution for an electrophoretic run (20 min at 300 mA and 25 V) in 300 mM NaOH/1 mM EDTA buffer and pH >13. At the end of electrophoresis, the slides were neutralized and dried at room temperature overnight. The dried slides were then rehydrated, fixed, dried again, and stained with 0.1% silver nitrate. DNA damage was assessed using the DNA damage index, which ranged from 0 (no damage) to 400 (maximum damage). For this, 100 nucleoids per slide (in triplicates per group) were selected and analyzed. The nucleoids were classified according to the length of the tail and received scores of 0 (no migration) to 4 (maximum migration).

Mutagenicity was evaluated using the micronucleus test, in accordance with the technique described by Schmid<sup>19</sup>. The slides, after being subjected to Panotype staining, were analyzed under a microscope with 1000  $\times$  magnification. For each slide, 500 cells were enumerated and classified in terms of the following variables: mononuclear cells with the presence of micronuclei, binucleate cells and binucleate cells with micronuclei, cells undergoing necrosis, and cells undergoing apoptosis.

Chromosomal instability was quantitatively evaluated by the G-banding cytogenetic technique described by Yunis<sup>20</sup>, who suggested the addition of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  colchicine in each leukocyte culture by subjecting it to incubation for 60 min at 37°C. The cells were subsequently centrifuged at 1800 rpm for 10 min. The cell pellets were resuspended in a hypotonic solution of 0.075 M potassium chloride and incubated at 37°C for 16 min. After further centrifugation, the cell pellets were resuspended in acetic acid/methanol (3:1), followed by further centrifugation. Three drops of the cell suspension were deposited on the slides and dried at room temperature. Fifty cells per sample were analyzed at 400 $\times$  magnification under the microscope to verify the density and distribution of chromosomes in metaphase. To determine the mitotic indices, the percentages of dividing cells and interphase cells were identified, using

10 fields in each slide, according to the following formula: MI (mitotic index) = [number of dividing cells/total number of cells observed] × 100.

For comparisons between groups, one-way analysis of variance was used, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### *In Silico* Testing

To characterize the toxicity of TRZ, computational analyses were conducted using the software *Molinspiration Cheminformatics*, 2017 version; *ADMET*, 2012 version; *Lazar Toxicology Prediction*, version 1.3 of 2004; and *pkCSM*, 2015 version. All of these softwares were freely available online.

In the software *Molinspiration Cheminformatics*, the bioactivity and mechanisms of action were investigated (Figures 1 and 2, respectively). Regarding the bioactivity results, a low modulation of G-protein-coupled receptors, ionic channels, nuclear receptors, and kinase and protease inhibitors by TRZ was identified, indicating that TRZ had no effect on the stimulation or inhibition of important molecular targets that support adrenergic and cholinergic effects. Moreover, no modulation of biosynthesis and cytoskeletal viability or at least no direct modulation by TRZ was suggested.

However, even within the context of toxicological prospection, as a possibility of mechanism of action, the software demonstrated a high binding capacity of TRZ to hydrogen acceptors (nON = 13), which suggests that TRZ interferes with hydrogen bonds in DNA, thereby inducing damage. Kashanian and Zeidali<sup>21</sup> specifically studied the DNA binding of this additive and stated that TRZ is a nitrous derivative that may induce allergic reactions and oxidative stress associated with DNA damage.

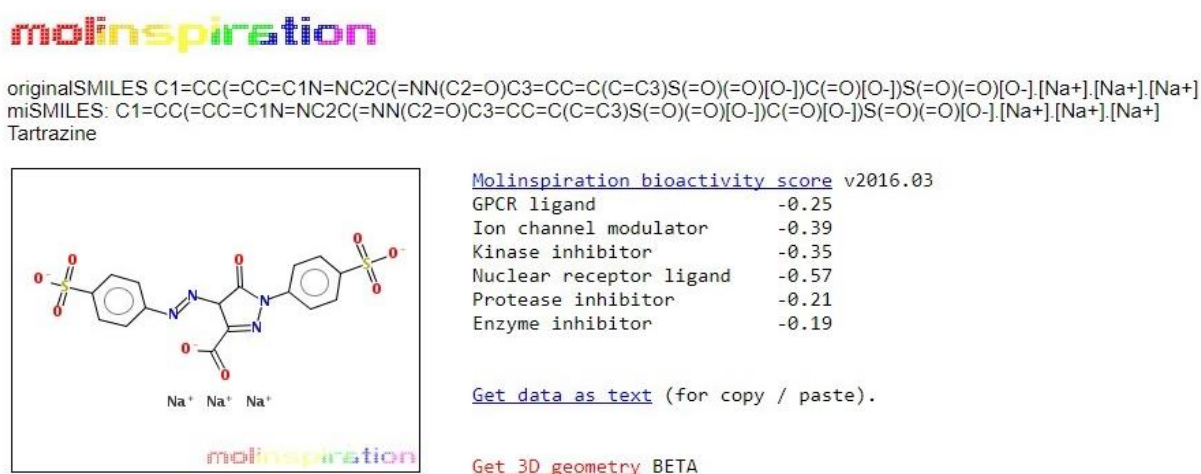
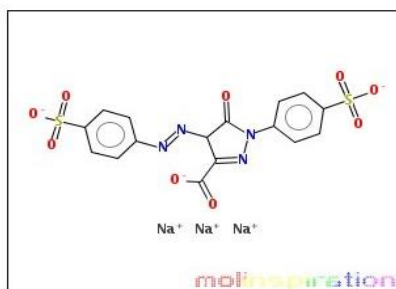


Figure 1. Bioactivity parameter assessment model *in silico* by *Molinspiration Cheminformatics* 2017 program.

originalSMILES: C1=CC(=CC=C1N=NC2C(=NN(C2=O)C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)[O-])C(=O)[O-])S(=O)(=O)[O-].[Na+].[Na+].[Na+]  
 miSMILES: C1=CC(=CC=C1N=NC2C(=NN(C2=O)C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)[O-])C(=O)[O-])S(=O)(=O)[O-].[Na+].[Na+].[Na+]  
 Tartrazine



[Molinspiration property engine v2016.10](#)

<a href="#">miLogP</a>	-2.90
<a href="#">IPSA</a>	211.93
<a href="#">natoms</a>	31
<a href="#">MW</a>	465.40
<a href="#">nON</a>	13
<a href="#">nOHNH</a>	0
<a href="#">nviolations</a>	1
<a href="#">nrotb</a>	6
<a href="#">volume</a>	333.24

[Get data as text](#) (for copy / paste).

[Get 3D geometry](#) BETA

Figure 2. Evaluation of the Mechanisms of action parameter *in silico* model by the program *Molinspiration Cheminformatics* 2017.

Overall, the interpretation of the results from the *Molinspiration Cheminformatics* software demonstrated the violation of two [polar surface area (PSA) and nON] of the five rules described by Lipinski<sup>22</sup> et al. These rules establish important structural parameters for predicting the oral bioavailability profile of substances. The five parameters established are as follows: (a) number of hydrogen bonding groups (nON)  $\leq 10$ ; (b) number of donor hydrogen bonding groups (nOHNH)  $\leq 5$ ; (c) molecular weight (MW)  $\leq 500$  g/mol; (d) octanol-water partition coefficient (miLogP)  $\leq 5$ , and (e) topological PSA  $\leq 140$  Å. Molecules that violate more than one of these rules will most likely have bioavailability problems<sup>23</sup>. However, it is worth remembering that the absorption process is consistent with the adequacy of the exposure or administration of molecules, but even if it decreases this process does not necessarily impair the toxicity of the molecules.

In addition, the ADMET software described that the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of TRZ, using data from fish models, is 1,000,000 µg/L (1 g/L) in water. This data represented an acute toxicity index, LC<sub>50</sub>, which expressed the concentration of the chemical in water capable of killing 50% of the animals during an observation period (generally 4 h).

The *Lazar Toxicology Prediction* software predicted the toxicity of TRZ based on data from rodent and bacterial models. According to this analysis, TRZ exhibited no carcinogenic activity for rats and mice nor mutagenic activity for *Salmonella typhimurium*. These results corroborate our findings from the micronucleus and chromosomal instability analyses. However, they differ from the results of the comet test with respect to the carcinogenic potential. In this context, it should be noted that, although desirable, computational model predictive tests have a limitation associated with the variables used in biological assays, such as the concentration or dose administered, exposure time, and the duration of the assays. Therefore, a perfect synergy does not always exist between the two modalities of analysis.

In the pkCSM software, kinetic parameters, molecular properties, and toxicity were evaluated (Figure 3). The results obtained suggest that TRZ has a low solubility in water and low permeability in human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (CACO-2). As for its

toxicity, it was classified as moderately toxic. All relevant results from the analysis of the TRZ dye are presented in Table 2.

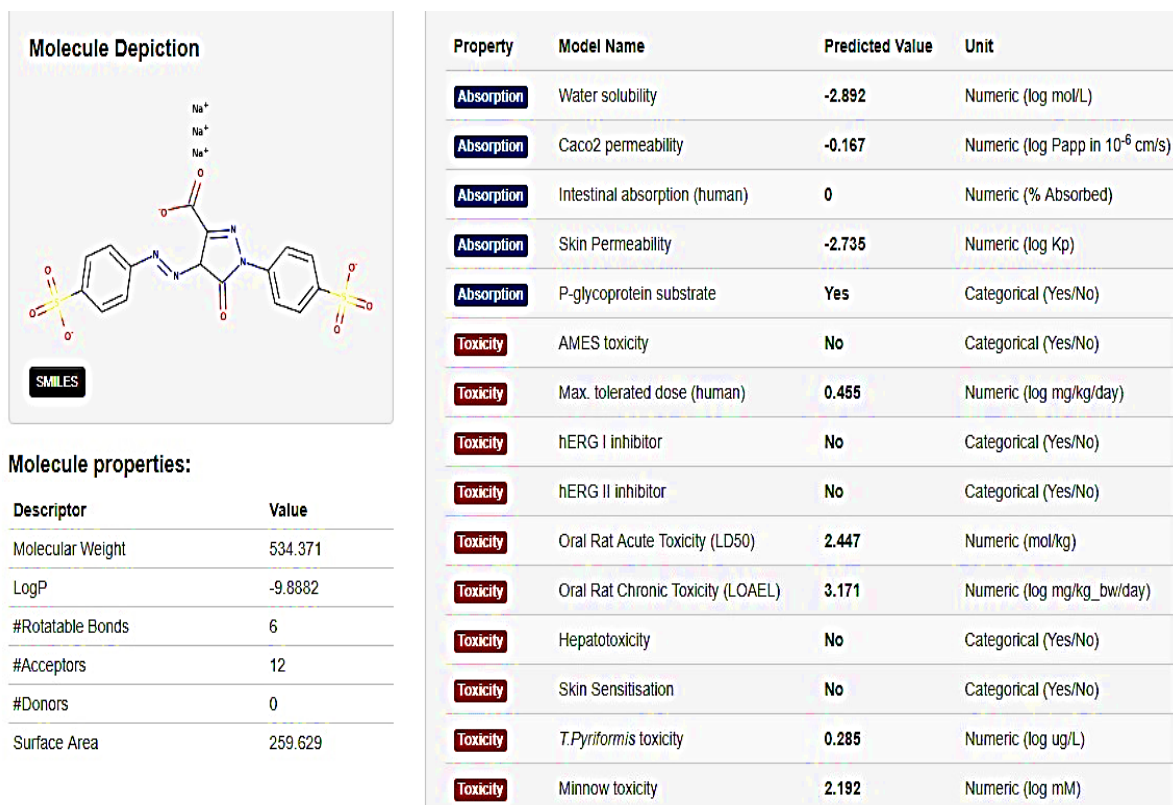


Figure 3. Evaluation of kinetic parameters, molecule property and TRZ dye toxicity through pKCSM 2015 software.

Table 1. Descriptive summary of the predictive evaluation of TRZ through each software used in predictive computational toxicological analyzes.

Software Used	Description Predictive assessment
<b>Molinspiration Cheminformatics (2017)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No effect on important molecular targets: GPCR, Ionic Channel, Nuclear Receptor and Protease Kinase inhibitors</li> <li>High binding capacity to the acceptors of H (genotoxic)</li> </ul>
<b>ADMET (2012)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Toxicity to fish: LC50&gt; 1000000 µg/L</li> </ul>
<b>Lazar Toxicology Prediction 1.3 (2004)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Non Carcinogenic for rats and mice.</li> <li>Non Mutagenic to <i>Salmonella typhimurium</i>.</li> </ul>
<b>pkCSM (2015)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Low solubility in water</li> <li>Low permeability in CACO-2</li> <li>Class 3 Moderately Toxic</li> </ul>

## Cytotoxicity Testing

Figure 4 shows that TRZ did not induce significant cytotoxicity under the experimental conditions and concentrations assayed in the human leukocyte culture, when compared with that for the negative control ( $p < 0.05$ ).

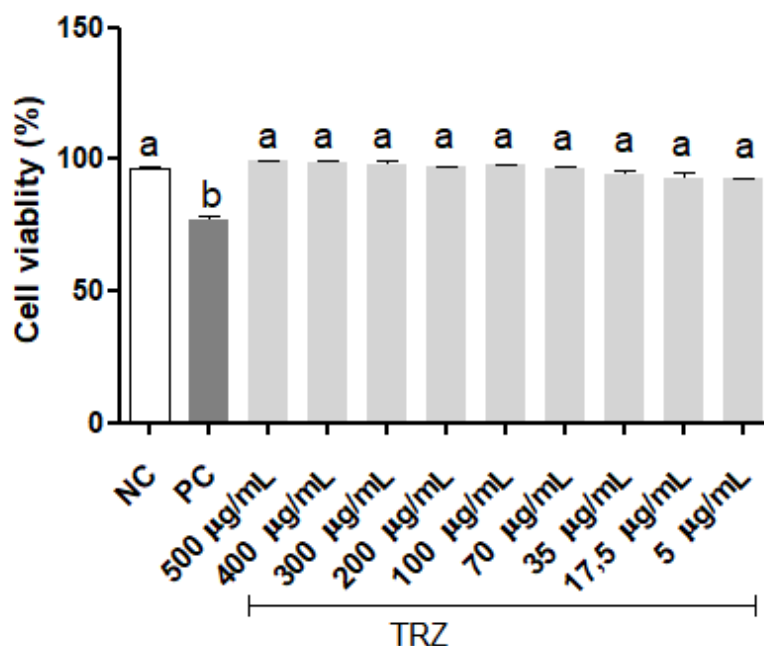


Figure 4. Cell viability test in human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ;  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; NC = negative control; PC = positive control.

These results corroborate those obtained in the study by Soares et al.<sup>24</sup> who evaluated the cytotoxicity of TRZ in human lymphocytes by measuring the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium levels using different concentrations of the dye, ranging from 1.3 to 341.9  $\mu\text{g/mL}$  (0.25–64.0 mM). In the present study, TRZ exhibited no cytotoxic effects at any of the concentrations tested, which was also confirmed by *in silico* assays in the same study. Notably, the concentrations tested in our study are within the range tested by the aforementioned study. However, these studies complement each other because the previous study evaluated cytotoxicity using mitochondrial bias, whereas our study used membrane bias.

In contrast to these findings, Sekeroglu et al.<sup>25</sup>, when evaluating the same dye in human lymphocytes, found that, cytotoxicity was present at the highest concentration tested (2,500  $\mu\text{g/mL}$ ), as represented by a significant decrease in the MI. However, this result is questionable because the concentration tested was much higher than that recommended (500  $\mu\text{g/mL}$ ) for *in vitro* and *ex vivo* tests. Additionally, the parameter evaluated was the most appropriate to infer genotoxicity rather than cytotoxicity.

## Genotoxicity Testing

To assess the risk of genotoxic and carcinogenic effects for humans, regulatory authorities in Europe, Japan, and the USA recommend that preclinical genotoxicity and carcinogenicity studies contribute to data compilation for the marketing of pharmaceutical products<sup>26</sup>. In this perspective, the genotoxic tests alkaline comet assay and the micronucleus test are two tests that are widely used in carcinogenic and mutagenic evaluations, respectively.

The TRZ induced DNA damage in human leukocytes at the concentration 70  $\mu\text{g/mL}$ . This damage was 19 times higher than negative control ( $p < 0.05$ ) (Figure 5).

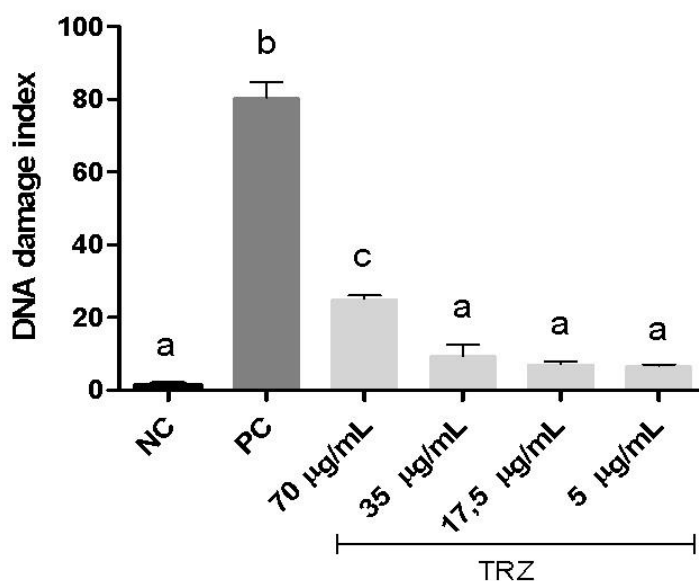


Figure 5. Index of DNA damage generated by the alkaline comet assay in human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ;  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; NC = negative control; PC = positive control.

Soares et al.<sup>24</sup> also used the DNA damage index determined by the comet test but with 3 h of *in vitro* incubation and found that the TRZ dye could induce significant genotoxic damage at all concentrations tested (0.116–29.79  $\mu\text{g/mL}$ ) in human lymphocytes. The authors suggested that the positive genotoxicity results were due to metabolism of the azoic group present in the dye, generating an amine byproduct that is known to be toxic. However, the results of our study are not in agreement with those of the aforementioned study and indicated that cell lesions may occur at twice the peak plasma concentration of TRZ (35  $\mu\text{g/mL}$ ), i.e., 70  $\mu\text{g/mL}$ .

Sasaki et al.<sup>7</sup> used mice in a comet assay to assess DNA damage in various organs and found genotoxicity, wherein TRZ caused DNA damage in the colon at doses close to the ADI (~7.5 mg/kg body weight) determined by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Based on such studies, the European Food Safety Authority (EFSA<sup>38</sup>) has expressed concerns about the potential genotoxicity of TRZ.

In addition, Khayyat et al.<sup>27</sup> reported that TRZ could induce oxidative DNA damage in leukocytes from adult Wistar rats at the same concentration as that used by Sasaki et al.<sup>7</sup> or 7.5

mg/kg body weight. Interestingly, the dose used was not corrected according to the metabolism of the animal model used, which is superior to that in humans, so that the results found could have been potentiated with the said correction.

In this context, interestingly, only 2% of orally administered TRZ is actually absorbed by the body. According to this data, we can extrapolate from the ADI (7.5 mg/kg body weight) that approximately 10.5 mg would be absorbed. If we consider the average amount of blood in an adult weighing 70 kg (7% of body weight, therefore approximately 5 L), the concentration of TRZ would be approximately 2.1 µg/mL. However, the peak plasma concentration of TRZ (35 µg/mL) is much higher than this concentration.

These calculations are presented to demonstrate that, unfortunately, prospecting does not appear to be linear and has to be worked on with caution. Although the absorption of TRZ is in fact 2%, there may be alterations that increase the plasma concentration of the dye, either before the beginning of absorption (during gastrointestinal flow delay) or via other types of kinetic interference during metabolism, distribution, and excretion.

However, our findings corroborate previous studies, which indicate the potential genotoxicity of TRZ for the experimental model adopted in our study. This further confirms the interpretation of the toxicity prediction data from *in silico* testing using the *Molinspiration Cheminformatic* software.

Within this problem, another aspect to consider is the metabolism of azo dyes in humans and other mammals, bacterial azoreduction, which invariably releases aromatic amines. Although only a small proportion of azo dyes is absorbed and reaches hepatic tissue<sup>28,30</sup>, this is sufficient to generate acute and chronic toxicity with genotoxic potential<sup>30,31</sup>.

In agreement with this, Amin et al.<sup>32</sup> suggested that aromatic amines generated from the action of azoreductases present in the intestinal microflora on nitrogen compounds can interact with nitrites and nitrates present in the stomach or in food, generating reactive oxygen species, which increase oxidative stress. Thus, it seems plausible that one of the mechanisms of DNA damage is oxidative bias.

Nevertheless, previous studies that corroborate our findings regarding the induction of DNA damage by TRZ are alarming, particularly if we consider the amount and frequency of its use by humans. For example, Husain et al.<sup>33</sup> in Kuwait and Rao et al.<sup>34</sup> in India indicated that TRZ consumption by children exceeds the ADI (7.5 mg/kg/day). This is particularly relevant for children's health because ADI is associated with body mass, and the current main limitations have been determined only for adults. In addition, TRZ is non-degradable, resulting in the bioaccumulation of the dye in living organisms, which can lead to various diseases and disorders<sup>35</sup>.

## Mutagenicity Testing

Figure 6 shows that, at all tested concentrations, up to the maximum recommended value for *in vitro* and *ex vivo* tests (500 µg/mL), TRZ did not exhibit mutagenicity by the micronucleus test, when compared with that for the negative control ( $p < 0.05$ ).

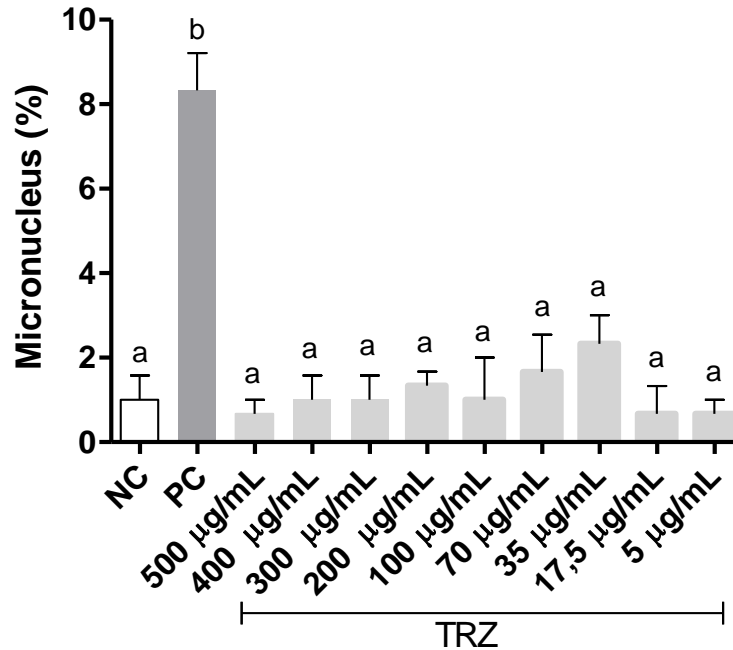


Figure 6. Micronucleus counting in culture of human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; NC = negative control; PC = positive control.

In contrast, Sekeroglu et al.<sup>25</sup> reported that TRZ had mutagenic potential in human lymphocyte cultures at a concentration of 2,500 µg/mL according to the micronucleus test. However, such an outcome can be questioned, considering that this concentration is extremely high for an *in vitro* or *ex vivo* evaluation and is thus expected to be toxic.

Bastaki et al.<sup>36</sup>, in response to a request by the EFSA, developed an *in vivo* study wherein no significant response to TRZ was found in a micronucleus bone marrow assay. In 2016, the JECFA also analyzed these data and concluded that there are no concerns about the mutagenicity of TRZ, which corroborates the results found in our study.

Chromosomal instability results in altered chromosomal numerical and structural complexes, which has been shown in several studies to be associated with cell lesions and a poor prognosis of solid tumors<sup>37</sup>. Our results demonstrated that all concentrations of TRZ assayed (5–500 µg/mL), showed levels of chromosomal normality within the range observed for the negative control ( $p < 0.05$ ) (Figure 7).

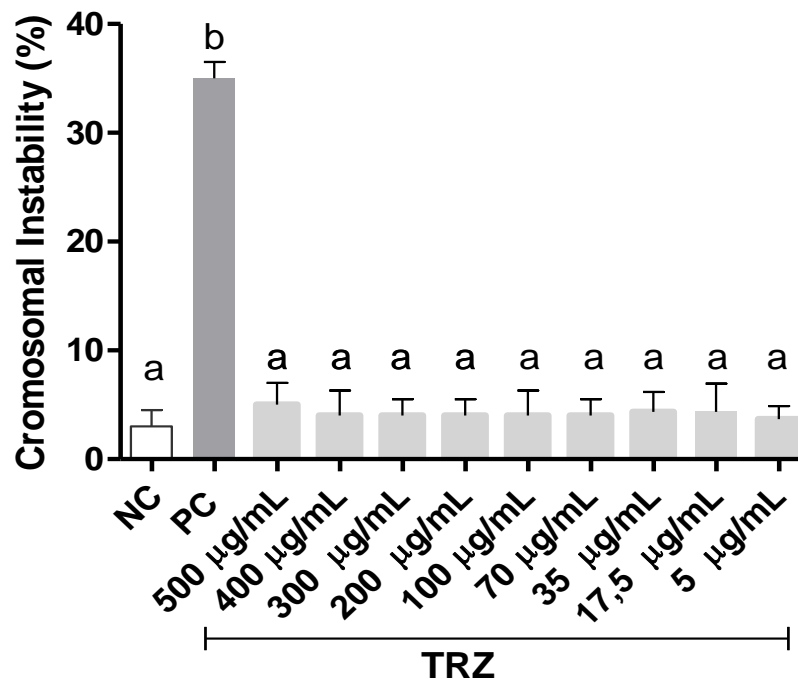


Figure 7. Numerical chromosomal instability assay in human leukocytes exposed to different concentrations of TRZ dye. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ;  $p < 0.05$ . The letters on the bars represent significant differences between the groups; NC = negative control; PC = positive control.

The lack of positive results in the chromosomal instability test could be partly explained by the fact that this process is directly associated with the accumulation of genetic alterations in multiple stages, occurring at the basal level in all human cells, whether tumorous or not; thus, with the non-reaction of human leukocytes in the other mutagenicity tests, the instability, consequently, does not present alterations.

### 3.4 CONCLUSION

In this study, we observed that TRZ could not induce cytotoxicity and mutagenicity in human leukocyte cultures at the concentrations and experimental conditions tested. However, DNA damage was induced at a concentration of 70  $\mu\text{g/mL}$ , which is twice the peak plasma concentration for the dye. However, there is little data on the bioaccumulation of TRZ. Considering this issue, changes in the body homeostasis could increase the plasma concentrations of the dye.

Further studies are required to confirm our results and expand the number of tests to better instrumentalize decision-making, considering the frequency of use of TRZ in the diet of the population, including that of children, as well as the exposure to TRZ through drugs, cosmetics, and other non-food products.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. S. KOBYLEWSKI and M. F. JACOBSON. Toxicology of food dyes. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 2012, 18 (3): 220-46.
2. P.R.P. CAMPOS. *Desenvolvimento e validação de um método de quantificação de corantes em amostras de suco artificial em pó*. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2014. 168p.
3. F. LIDON and M. M. SILVESTRE. *Indústrias Alimentares - Aditivos e Tecnologia*. 1ª Ed. Editora Escolar: 2007. 380p.
4. A. MITTAL, L. KURUP and J. MITTAL. Freundlich and langmuir adsorption isotherms and kinetics for the removal of tartrazine from aqueous solutions using hen feathers. *J. Hazar. Mater.*, 2007, 146 (1–2): 243–48.
5. N. MEHEDI, S. AINAD-TABET, N. MOKRANE, S. ADDOU, C. ZAOU, O. KHEROUA and D. SAIDI. Reproductive toxicology of tartrazine (FD and C Yellow No. 5) in Swiss albino mice. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.*, 2009, 4 (4): 128–133.
6. M. PARK, et al. Risk assessment for the combinational effects of food color additives: neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 2009, 72 (21-22): 1412-23.
7. Y.F. SASAKI, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mut. Res.*, 2002, 519 (1-2): 103-119.
8. R.J. MICIC, S.S. MITIC, A.N. PAVLOVIC, D.A. KOSTIC and M.N. MITIC. Application of Tartrazine for Sensitive and Selective Kinetic Determination of Cu (II) Traces. *J. Anal. Chem.*, 2014, 69 (12): 1147–52.
9. P. da S. RODRIGUES. *Estudo do uso de corantes artificiais em alimentos e estimativa de ingestão de tartrazina pela população brasileira*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. 105p.
10. I.L.D. MOUTINHO, L.C. BERTGES and R.V.C. ASSIS. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow nº5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Braz. J. Biol.*, 2005, 67: 141-45.
11. A. S. FREITAS. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Technol.*, 2012, 7 (2): 65-72.
12. C.M. GUEZ, et al. Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2017; 53(1):e15098.
13. M.E. BUROW, et al. Differences in susceptibility to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res.*, 1998, 58: 4940-46.

14. J.B. KONOPKA, et al. Mutation of Pro-258 in transmembrane domain 6 constitutively activates the G protein-coupled alpha-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(13):6764-69.
15. N. SINGH, M. MCCOY, R. TICE, and E. SCHNEIDER. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1995, 175 (1): 184–91.
16. R. R. TICE, et al. Single cell gel/cometa assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Molecul. Mutagen.*, 2000, 35 (3): 206-221.
17. A. HARTMANN, E. AGURELL, C. BEEVERS, S. BRENDLER-SCHWAAB, B. BURLINSON, P. CLAY, A. COLLINS, G. SMITH, G. SPLEIT, V. THYBAUD and R.R.TICE. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 2003, 18 (1): 45-51.
18. S. NADIN, L. VARGAS-ROIG and D. CIOCCA. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.*, 2001, 49 (9): 1183-86.
19. W. SCHIMID. The Micronucleus Test. *Mut. Res.*, 1975, 31 (1): 09-15.
20. J.J. YUNIS. High resolution of human chromosomes. *Science*, 1976, 191 (4233): 1268–1270.
21. S. KASHANIAN and S.H. ZEIDALI. DNA binding studies of tartrazine food additive. *DNA Cell Biol.* 2011, 30 (7): 499-505.
22. C. A. LIPINSKI, F. LOMBARDO, B.W. DOMINY and P. J. FEENEY. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Ad. Drug Disc. Revs.* 1997, 23: 3-25.
23. J. P. de A. SOUZA, R. B. ROMERO and A. L. ROMERO. *Síntese e Estudo in silico de propriedade farmacocinéticas dos Naproxenatos de Timila e de Eugenila*. Anais do VII CONCCEPAR: Congresso Científico da Região Centro-Ocidental do Paraná. 2016.
24. B. M. SOARES, et al. Effects on DNA Repair in Human Lymphocytes Exposed to the Food Dye Tartrazine Yellow. *Anticancer Res.*, 2015, 35 (3): 1465-74.
25. Z.A. SEKEROGLU, B. GUNES, S.K. YEDIER, V. SEKEROGLU and B. AYDIN. Effects of tartrazine on proliferation and genetic damage in human lymphocytes. *J. Toxicol. Mech. Methods*, 2017, 27(5): 370-75.
26. G. BRAMBILLA and A. MARTELLI. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. *Mut. Res.*, 2009, 612 (2): 115-49.
27. L. KHAYYAT, A. ESSAWY, J. SOROUR and A. SOFFAR. Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects *in vivo*. *PeerJ*. 2017, 5: e3041.

28. F. RAFII, J. D. HALL and C. E. CERNIGLIA. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food chem. Toxicol.*, 1997, 35(9): 897-901.
29. N. PUVANESWARI, J. MUTHUKRISHNAN and GUNASEKARAN, P. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian J. Exp. Biol.*, 2006, 44 (8): 618-626.
30. S. TSUDA, M. MURAKAMI, N. MATSUSAKA, K. KANO, K. TANIGUCHI and Y. F. SASAKI. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicol. Sci.*, 2001, 61 (1): 92-99.
31. A. BAFANA, S. DEVI and T. CHAKRABARTI. Azo dyes: past, present and the future. *Environ. Rev.* 2011, 19 (NA): 350-370.
32. K. A. AMIN, H. A. HAMEID II and A. H. A. ELSTTAR. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48 (10): 2994–99.
33. A. HUSAIN, W. SAWAYA, A. AL-OMAIR, S. AL-ZENKI and H. AL-AMIRI. Estimates of dietary exposure of children to artificial food colours in Kuwait. *Food Addit. Contam.* 2006, 23 (3): 245-251.
34. P. RAO, R.V. BHAT and R.V. SUDERSHAN. Exposure assessment to synthetic food colors of a selected population in Hyderabad, India. *Food Addit. Contam.* 2004, 21 (5): 415-421.
35. S. BANERJEE and M.C. CHATTOPADHYAYA. Adsorption characteristics for the removal of a toxic dye, tartrazine from aqueous solutions by a low cost agricultural by-product. *Arabian J. Chem.*, 2017, 10 (Suppl 2): S1629-S1638.
36. M. BASTAKI, T. FARRELL, S. BHUSARI, K. PANT and R. KULKARNI. Lack of genotoxicity *in vivo* for food color additive Tartrazine. *Food Chem. Toxicol.*, 2017, 105:278-284.
37. N. J. BIRKBAK, A. C. EKLUND, Q. LI, S. E. McCLELLAND, D. ENDESFELDER, P. TAN, I. B. TAN, A. L. RICHARDSON, Z. SZALLASI and SWANTON, C. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res.*, 2011, 71 (10): 3447-52.
38. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on the food colour Red 2G (E128) based on a request from the Commission related to the re-evaluation of all permitted food additives. *The EFSA Journal*, Parma, 2007, 515: 1-28.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de diferentes protocolos de análises toxicológicas utilizando o corante Tartrazina são importantes para a obtenção de informações e dados ainda não disponíveis na literatura científica. Uma das alternativas que tem ganhado atenção com o desenvolvimento tecnológico é a metodologia *in silico* ou experimentação através de simulação computacional, que prevê o comportamento de um determinado composto elegendo variáveis presentes em organismos vivos através de aplicações matemáticas específicas estabelecidas a partir de base de dados associada a moléculas (VALLE, 2009). A utilização desse modelo auxiliou na predição de toxicidade, porém a sua utilização individual não é suficiente para explorar todas as possibilidades, pois todo método *in silico* tem suas limitações preditivas, por isso, a necessidade de submeter a molécula de tartrazina aos demais testes *in silico* complementares, a fim de que seus resultados cooperassem com os desenhos experimentais *in vitro*, e que o processo de experimentação obtivesse resultados passíveis de serem confrontados com vistas a um posicionamento final quanto sua toxicidade e, por extensão, à sua segurança de uso, e talvez, futuramente, associado ainda a teste *in vivo*.

A utilização de protocolos de testes toxicológicos tem se mostrado fundamental ao longo dos anos, pois a preocupação acerca dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos induzidos por diferentes compostos à população humana, consumidos e expostos, é cada vez maior. O monitoramento adequado de tais agentes vem sendo considerado como um dos mecanismos de prevenção e controle de algumas reações adversas e efeitos colaterais relevantes, o que inclui diversas desordens genéticas (WHO, 1993). Alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos desses compostos, podendo predizer um perfil de segurança e/ou eficácia dessas moléculas. Numerosos produtos químicos, potencialmente mutagênicos, têm sido estudados, principalmente porque podem causar mudanças prejudiciais e herdáveis no material genético, sem ser imediatamente expressas (CAPELA, 2001).

Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992). Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *ex vivo* e *in vivo* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e do potencial de carcinogenicidade de

agentes microbiológicos, químicos ou físicos (HARTMANN, 2003; MALUF; ERDTIMANN, 2003).

Tendo esses pressupostos como base, os estudos genotóxicos ganham notoriedade em sua relação com a segurança de uso de drogas, fármacos, insumos farmacêuticos, contaminantes ambientais antropogênicos em geral, entre outros, principalmente quando os são utilizados ou protagonizam uma perspectiva de uso ou exposição prolongados (POWERS et al., 1995; HOVHANNISYAN, 2010; LIU et al., 2012), como é o caso do corante TRZ, composto protagonista deste estudo. Neste estudo, os resultados *in silico* e *ex vivo* apontam para a presença de potencial carcinogênico para a TRZ. De modo singular, a concentração de 70 µg/mL induziu a danos de DNA em leucócitos humanos aproximadamente 19 vezes maior que o observado no controle negativo. Apesar do pico plasmático da TRZ ser de 35 µg/mL, não é difícil de se atingir a concentração de dano supracitada.

## 5. CONCLUSÃO

A análise preditiva *in silico* da TRZ, segundo o *software Molinspiration*, indica potencial carcinogênico para o corante.

Considerando a exposição de células leucocitárias ao corante TRZ em faixas de concentrações que variaram entre 5 µg/mL a 500 µg/mL e período de incubação de 72 horas, foi possível concluir que:

Nenhuma das concentrações utilizadas para testar citotoxicidade e mutagenicidade (5, 17,5, 35, 70, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL) apresentou resultados significativos relacionados tanto à lesão membranar quanto a alterações cromossômicas, incluindo sua quebra ou desorganização.

Em contrapartida, na avaliação do índice de dano ao DNA (teste cometa alcalino), foi observado dano à estrutura de DNA na concentração 70 µg/mL, apresentando um marco referencial para lesões de DNA frente à exposição à TRZ.

Contudo, estudos complementares são necessários para fundamentar o(s) mecanismo(s) da lesão de DNA evidenciada, como também estudos com outros tipos celulares e em modelos *in vivo*; ou ainda, estudos envolvendo humanos que utilizam o corante de forma contínua.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ASHFAQ, N.; MASUD, T. Surveillance on Artificial Colours in Different Ready to Eat Foods. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 5, p. 223-225, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - CNNPA nº 12**, de 24 de julho de 1978. Aprova normas técnicas especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. Diário Oficial da União, Brasília, 24 jul. 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540 – SVS/MS**, de 27 outubro 1997. Aprova o regulamento técnico: aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União, Brasília, 28 out. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares. **INS: International Numbering System**. Diário Oficial da União, Brasília, 28 nov. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. **RDC nº 259**, de 23 de setembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 23 set. 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). **RDC nº. 45**, de 03 de novembro de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, 03 nov. 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. As empresas fabricantes de alimentos que contenham na sua composição o corante tartrazina (INS 102) devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso. **RDC nº 340**, de 13 de dezembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 13 dez. 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Limites máximos para aditivos excluídos da lista de “aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF)”. **RDC nº46**, de 3 de novembro de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, 3 nov. 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fórmulas infantis destinadas a lactentes e crianças de primeira infância. **RDC nº 46**, de 19 de setembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, 19 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº. 48**, de 10 de abril de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, 10 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC nº 42**, de 19 de setembro de 2011, que dispõe sobre o regulamento técnico de compostos de nutrientes para alimentos destinados a lactentes e a crianças de primeira infância. **RDC nº 45** de 25 de setembro de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, 25 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540**, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de outubro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº 30**, de 24 de julho de 2007. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Considera corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida). **Resolução - CNNPA nº 44**, de 177. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691. **Decreto nº 55871**, de 26 de março de 1965. Diário Oficial da União, Brasília, 26 mar. 1965.

CAMPOS, P.R.P. **Desenvolvimento e Validação de um Método de Quantificação de Corantes em Amostras de Suco Artificial em Pó**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós Graduação em Química. Natal, 2014. 168p.

CAPELA, F. S. **Avaliação de Biomarcadores**. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 2001.

COMBES, R. D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**. v. 24. p. 950-954, 1992.

DALL'AGNOL, R.P.A. Utilização de corantes artificiais em produtos alimentícios no Brasil/ The utilization of artificial colorings in alimentary products in Brazil. In: Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica, 4., 2013, Aracaju. **Anais...** Aracaju: SIMTEC, 26-37p. 2013.

DI LORENZO, G. et al. Urinary metabolites of histamine and leukotrienes before and after placebo-controlled challenge with ASA and food additives in chronic urticarial patients. **Allergy**, v. 12, n. 57, p. 1180-1186, 2002.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 05-22, 2000.

DURNEV, A.D.; ORESHCHENKO, A.V.; KULAKOVA, A.V.; BERESTEN, N.F. Análise da atividade citogenética de corantes alimentares. *Voprosy Meditsinskoi Khimii*, v. 41, n.5, p. 50-53, 1995.

FAO/WHO. Food and Nutrition Paper. **Risk management and food safety** - Report of a Joint FAO/WHO Consultation Rome, Italy, 27 to 31 January 1997.

FERREIRA, F. de S. Aditivos Alimentares e Suas Reações Adversas No Consumo Infantil. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 13, n. 1, p. 397-407, 2015.

FREITAS, A.S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2012.

GAO, Y.; LI, C.; YIN, H., AN, X.; JIN, H. Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 125-129, 2011.

GIRI, A.K.; DAS, S.K.; TALUKDER, G.; SHARMA, A. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations induced by curcumin and tartrazine on mammalian cells *in vivo*. **Cytobios**, v.62, n. 249, p. 111-117, 1990.

GOMES, K.M.S; OLIVEIRA, M.Y.G.A.; CARVALHO, F.R.S.; MENEZES, C.C.; PERON, A.P. Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-10), Bordeaux Red (E-123) and Tartrazine Yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Science and Technology**, v. 33, n.1, p. 218-223, 2013.

GUIMARÃES, N.M.C.P. **Perturbação de Hiperatividade e Défice de Atenção – para além da genética**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina), Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar –Universidade do Porto, Porto, 2010. 31p.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, G.; SPLEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n.1, p. 45 - 51, 2003.

HONORATO, T.C.; BATISTA, E.; NASCIMENTO, K. de O, do.; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 01-11. 2013.

HOVHANNISYAN, G. G. Fluorescence *in situ* hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular Cytogenetics**, v. 3, n. 17, p. 1-11, 2010.

ISHIDATE, M.; SOFUNI, J.; YOSHIKAWA, K. Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. **Gann Monograph on Cancer Research**, v. 27, p. 95-108, 1981.

ISHIDATE, M.; SOFUNI, T.; YOSHIKAWA, K.; HAYASHI, M.; NOHMI, T.; SAWADA, M.; MATSUKA, A. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 8, p. 623-636, 1984.

JAIN, R.; BHARGAVA, M.; SHARMA, N. Electrochemical Studies on a Pharmaceutical Azo Dye: Tartrazine. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, n.2, p. 243–247, 2003.

KOBYLEWSKI, S.; JACOBSON, M. F. Toxicology of food dyes. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 18, n. 3, p. 220-246, 2012.

LIDON, F.; SILVESTRE, M. M. *Indústrias Alimentares - Aditivos e Tecnologia*. 1ª Ed. **Editora Escolar**: 2007. 380p.

LIU, X. et al. Potential and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. **Toxicology Letters**, v. 211, n. 1, p. 70-76, 2012.

MALUF, S. W., ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**, 2003.

MARMITT, S.; PIROTTA, L.V.; STULP, S. Aplicação de fotólise direta e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. **Química Nova**, vol.33, n.2, p.384-388, 2010.

MARTINS, M. S. Uso de corantes artificiais em alimentos: legislação brasileira. **Aditivos e Ingredientes**, v. 1, n.122, p.32-37, 2015.

MENDA, M.; MARTINHO, L.A.P.; MONTEIRO, A.; MASSABNI, A.C. Corantes e Pigmentos. **Química Viva**, Conselho Regional de Química IV Região. 2011. 4p.

MICIC, R.J.; MITIC, S.S.; PAVLOVIC, A.N.; KOSTIC, D.A.; MITIC, M.N. Application of Tartrazine for Sensitive and Selective Kinetic Determination of Cu (II) Traces. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 69, n. 12, p. 1147–1152. 2014.

MORAES, A.C. de A; KAPP, A.P.; MILANI, F.; IWAZAKI, M.M. **Presença de Corantes em Alimentos Consumidos com Frequência pelo Público Infantil**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição). Universidade Municipal de São Caetano do Sul. 2015. 32p.

MOUTINHO, I.L.D.; BERTGES, L. C.; ASSIS, R. V. C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow nº5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal Biology**, v.67, n.1, p.141-145, 2007.

MULTON, J.L. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Zaragoza (España): **Editorial Acribia S.A.** 806p. 2000.

NINNI, K. Refeições no Escuro: Alergias, rinite, hiperatividade e tumores são possíveis males da exposição aos corantes. In: **Química no dia a dia**, p. 40-41, 2015.

PETRIN, N. Química dos Corantes - História, Características e Indústria de Alimentos. **Editorial EF**, 2015. 60p.

POLÔNIO, M.L.T. **Percepção de mães quanto aos riscos à saúde de seus filhos em relação ao consumo de aditivos alimentares: o caso dos pré-escolares do Município de Mesquita**. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010. 129p.

POLÔNIO, 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. 1653-1666. 2009.

POWERS, R. E.; LAWTON, G. P.; MODLIN, I. M. Genotoxicity, carcinogenicity and acid-suppressing medications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 65, n.3, p. 303-17, 1995.

PRADO, M.A.; GODOY, H.T. Corantes Artificiais em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v.14 n. 2, p. 237-250. 2003.

QUEIRÓS, M.A.; RODRIGUES, L.M. A cor dos Alimentos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 25, n. 80, p. 01-06, 2001.

RODRIGUES, P da S. **Estudo Do Uso De Corantes Artificiais Em Alimentos E Estimativa De Ingestão De Tartrazina Pela População Brasileira**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2015. 105p.

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

SCHUMANN, S.P.A.; POLÔNIO, M.L.T.; GONÇALVES, E.C.B.A. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 534-539, 2008.

VALLE, M. *In silico* – uma alternativa viável aos experimentos in vivo?. **Conecte**, Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, v. 05, n. 1, p 70-75, 2009.

WHO. World Health Organization. International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles**. Geneva, 1993.

## GUIDELINES FOR AUTHORS ON HOW TO WRITE AND STRUCTURE AN ARTICLE

### **Format & layout of your article**

Keep your writing clear and concise, avoiding repetition or embellishment. All submissions must be in English. We permit standard English and American spelling in our journals, but please use one or the other consistently within the article itself. You are welcome to use common or standard abbreviations; if your abbreviations are non-standard, please include a definition the first time you use them.

All articles accepted for publication in our journals are edited and typeset to our house style by professional editors: the manuscript will be formatted for you.

This section describes the content to be included in your article. Note that headings and subheadings are not permitted in articles submitted to *ChemComm*, although they are permitted in Communications submitted to other journals.

### ***Title***

The title should be short and straightforward to appeal to a general reader, but detailed enough to properly reflect the contents of the article. Think about keywords and using recognisable, searchable terms – around 70% of our readers come directly via search engines. Avoid the use of non-standard abbreviations and symbols; examples follow.

**An effective title** ‘Alkylation of active methylene compounds with alcohols catalysed by an iridium complex’.

**An ineffective title** ‘Active methylene compounds are alkylated with ROH under catalysis of [IrCl(cod)]<sub>2</sub>’.

### ***Authorship***

Full names and affiliations for all the authors should be included. Everyone who made a significant contribution to the conception, design or implementation of the work should be listed as co-authors. The corresponding author has the responsibility to include all (and only) co-authors. The corresponding author also signs a copyright licence on behalf of all the authors.

If there are more than 10 co-authors on the manuscript, the corresponding author should provide a statement to specify the contribution of each co-author. It is possible to have two corresponding authors. Please identify co-corresponding authors on your manuscript's first page and also mention this in your comments to the editor and/or cover letter.

### ***Abstract***

The abstract should be a single paragraph (50–250 words) that summarises the content of the article. It will help readers to decide whether your article is of interest to them.

It should set out briefly and clearly the main objectives and results of the work; it should give the reader a clear idea of what has been achieved. Like your title, make sure you use recognisable, searchable terms and keywords.

## ***Introduction***

An introduction should 'set the scene' of the work. It should clearly explain both the nature of the problem under investigation and its background. It should start off general and then focus in to the specific research question you are investigating. Ensure you include all relevant references.

## ***Experimental***

You should provide descriptions of the experiments in enough detail so that a skilled researcher is able to repeat them. Standard techniques and methods used throughout the work should just be stated at the beginning of the section; descriptions of these are not needed. Any unusual hazards about the chemicals, procedures or equipment should be clearly identified.

Authors are encouraged to make use of electronic supplementary information (ESI) for lengthy synthetic sections. In general there is no need to report unsuccessful experiments.

Only non-standard apparatus should be described; commercially available instruments are referred to by their stock numbers (for example, Perkin-Elmer 457 or Varian HA-100 spectrometers). The accuracy of primary measurements should be stated.

Suitable characterisations of compounds must be included - .

For studies that involve the use of live animals or human subjects please refer to our Human & Animal Welfare policy.

## ***Results & discussion***

This is arguably the most important section of your article.

Your results should be organised into an orderly and logical sequence. Only the most relevant results should be described in the text; to highlight the most important points. Figures, tables, and equations should be used for purposes of clarity and brevity. Data should not be reproduced in more than one form, for example in both figures and tables, without good reason.

The purpose of the discussion is to explain the meaning of your results and why they are important. You should state the impact of your results compared with recent work and relate it back to the problem or question you posed in your introduction. Ensure claims are backed up by evidence and explain any complex arguments.

## ***Conclusions***

This is for interpretation of the key results and to highlight the novelty and significance of the work. The conclusions should not summarise information already present in the article or abstract. Plans for relevant future work can also be included.

## ***Conflicts of interest***

In accordance with our policy on Conflicts of interest please ensure that a conflicts of interest statement is included in your manuscript here. Please note that this statement is required for all submitted manuscripts. If no conflicts exist, please state that 'There are no conflicts to declare'.

## ***Acknowledgements***

Contributors (that are not included as co-authors) may be acknowledged; they should be as brief as possible. All sources of funding should be declared.

## **Footnotes**

Footnotes relating to the title and/or authors, including affiliations, should appear at the very bottom of the first page of the article. If ESI is available this is also stated here.

## **Bibliographic references & notes**

We will format your content according to our house style before publication; however, it's important you use Vancouver style (not Harvard style) for all journals except , which requires the use of Harvard referencing.

You can also automatically format references from your Endnote citation manager using our style files.

Notes relating to the main text should appear at the end of the article, just above the references. These might include:

- comments relevant to but not central to the matter under discussion
- limited experimental and spectral data
- crystallographic data.

## **Referencing in the text**

Use superscript numbers to show the reference source of statements in the text – for example, *reactive small molecule species*.<sup>3</sup> Usually these should appear at the end of the sentence (after the punctuation), but can be after the relevant word or compound. The reference numbers should be cited in the correct sequence through the text (including those in tables and figure captions, numbered according to where the table or figure is designated to appear).

If a statement has multiple references you should reference all of the citations in the text. If you have two citations, or if you have more than two and the numbers are not consecutive, use commas (with no spaces) between numbers, examples: <sup>12,13</sup> or <sup>12,14,15</sup>. If there are more than two numbers and they are consecutive, use an en-dash to separate the first and last citation – for example, <sup>14-20</sup>.

The author(s) can be mentioned at their first citation in the text, but initials are not necessary. For papers with one or two authors simply state the surname(s), and for papers with three or more authors you should use the first author's surname followed by *et al.*

## **Listing your references**

The references themselves are listed in numerical order at the end of the main article. The names and initials of all authors should be given in the reference.

## **Journal articles**

The journal abbreviations to be used in Royal Society of Chemistry publications are defined in Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI). If you cannot find a recognised abbreviation for a journal and it is not obvious how the title should be abbreviated, please cite the full journal title.

Journal articles should be cited in the form: A. Name, B. Name and C. Name, *Journal Title*, year, **volume**, page.

Inclusion of article title is optional for most journals, but required for , and *Toxicology Research*.

When page numbers are not yet known, articles should be cited by DOI (Digital Object Identifier) – for example, T. J. Hebden, R. R. Schrock, M. K. Takase and P. Müller, *Chem. Commun.*, 2012, DOI: 10.1039/C2CC17634C.

**Books:** A. Name, B. Name and C. Name, *Book Title*, Publisher, Publisher Location, year. For example, S T Beckett, *Science of Chocolate*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000. If you are referencing published conference proceedings, these should be cited like a book.

**Book chapters:** A. Name, in *Book Title*, ed. Editor Name(s), Publisher, Publisher Location, edition, year, chapter, pages. The ‘ed.’ in the example above stands for ‘edited by’, that is, the editor(s) of the book; if the book has no editors this can be left out.

**Theses:** A. Name, PhD thesis, University Name, year.

**Lectures, meetings & conferences:** A. Name, presented in part at Conference Title, Place, Month, year.

### Reference to unpublished material

If you reference unpublished material in your article you must provide the editor with copies of the manuscripts with your submission. You should not reference unpublished work without the permission of those who completed the work.

For material accepted for publication, but not yet published: A. Name, *Journal Title*, in press. For material submitted for publication, but not yet accepted: A. Name, *Journal Title*, submitted. For material that has yet to be submitted for publication: A. Name, unpublished work.

**Online resources (including databases, websites & wikis):** Name of resource, URL, (accessed date). Please note the most important information to include is the URL and the date accessed. For example, The Merck Index Online, <http://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/mono1500000841>, (accessed October 2013).

**Preprint servers (for example, arXiv):** For example: V. Krstic and M. Glerup, 2006, arXiv:cond-mat/0601513.

**Patents:** You should provide the name of the patentee(s), patent issuer, patent number and year. For example: J. C. Chung, US Pat., 20100105549A1, 2010; Nippon Telegraph & Telephone, Jpn. Pat., 2013034915A, 2013.

**Software:** T. Bellander, M. Lewne and B. Brunekreef, GAUSSIAN 3 (Revision B.05), Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2003.