



## Microingredientes aromatizantes sintéticos artificiais em associação: triagem para a atividade citotóxica e genotóxica

Ila Monize Sousa Sales<sup>1</sup>, Fabelina Karollyne Silva dos Santos<sup>1</sup>, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva<sup>2</sup>, João Marcelo de Castro e Sousa<sup>1</sup> e Ana Paula Peron<sup>2,3\*</sup>

Recebido: 15 de março de 2016 Recebido após revisão: 31 de julho de 2016 Aceito: 19 de setembro de 2016  
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3677>

**RESUMO:** (Microingredientes aromatizantes sintéticos artificiais em associação: triagem para a atividade citotóxica e genotóxica). Objetivou-se neste trabalho avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de aromatizantes alimentares sintéticos artificiais de Biscoito e Baunilha, nas doses 0,3; 0,6 e 0,9 mL, associados entre si a partir dos tratamentos 0,3 mL + 0,3 mL; 0,6 mL + 0,6 mL e 0,9 mL + 0,9 mL. A avaliação se deu por meio de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L., nos tempos de exposição 24 e 48 horas. Os meristemas de raízes, após fixados, hidrolisados e corados, foram analisados em microscópio óptico, onde se avaliou para cada controle e tempo de exposição dos tratamentos um total de 5.000 células. Todas as associações em estudo, nos dois tempos de exposição considerados, reduziram significativamente a divisão celular. Também ocasionaram número estatisticamente significativo de alterações de fuso mitótico e micronúcleos nas células do tecido em estudo. Dessa forma, os aromatizantes alimentares de Biscoito e Baunilha em associação, nas condições de estudos estabelecidas, foram citotóxicos e genotóxicos às células de meristemas de raízes de *A. cepa*.

**Palavras-chave:** aditivos de aroma e sabor; toxicidade, divisão celular, anomalias de fuso mitótico, micronúcleos.

**ABSTRACT:** (Artificial synthetic flavoring micro-ingredients used in association: a screening of their cyto- and genotoxic activities). We aimed to evaluate the cyto- and genotoxicity of Cookie and Vanilla artificial synthetic food flavorings at doses 0.3, 0.6, and 0.9 mL, used in association as the following treatments: 0.3 + 0.3 mL; 0.6 + 0.6 mL; and 0.9 + 0.9 mL. The assay was conducted using meristematic root cells of *Allium cepa* L., with exposure times of 24 and 48 h. After fixation, hydrolysis, and staining of root meristems, a total 5000 cells were analyzed under light microscopy for assessment of each control and exposure time. All studied associations, at both exposure times, showed a significant decrease in cell division. Treatments also showed a statistically significant increase in number of alterations in the mitotic spindle and micronuclei of cells from the studied tissue. Thus, food flavorings Cookie and Vanilla, when used in association and under the experimental conditions adopted in our study, are both cyto- and genotoxic to meristematic root cells of *A. cepa*.

**Keywords:** aroma and flavor additives, toxicity, cell division, mitotic spindle abnormalities, micronuclei.

### INTRODUÇÃO

Os aditivos ou microingredientes alimentares tornaram-se obrigatórios na alimentação moderna, sobretudo por sua capacidade em manter, por longa data, a qualidade e a validade de alimentos comercializados em supermercados (Xu *et al.* 2013). Dentre tais substâncias, os aromatizantes têm especial importância devido conferirem propriedades sensoriais de aroma e sabor aos mais variados tipos de alimentos industrializados (Konishi *et al.* 2011).

Na indústria, os microingredientes aromatizantes são classificados em naturais, sintéticos idênticos aos naturais e sintéticos artificiais (More *et al.* 2012). Possuem formulação complexa, constituída por uma variedade de compostos químicos, como os de ação diluente, antioxidante, antiespumante, conservante, emulsificante e estabilizante (Brasil 2007, Koca *et al.* 2015). Em âmbito mundial, tais aditivos são regulamentados pelas agências *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *Flavour and Extract Manufacturer Association* (FEMA) (Xu *et al.*

2014), e nacionalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007 (Brasil 2007). De acordo com o Regulamento Técnico sobre Aromatizantes/Aroma e Sabor, aprovado pela ANVISA em 2007 e ainda em vigência, a formulação de qualquer aromatizante alimentar sintético é padronizada, sendo de responsabilidade das agências de segurança alimentar a fiscalização de sua composição (Brasil 2007).

Apesar de conferirem propriedades organolépticas essenciais aos alimentos industrializados, estes aditivos são considerados um avanço polêmico da área de ciência e tecnologia de alimentos por muitos profissionais da área da saúde (Konishi *et al.* 2011). Especialistas relatam que estes ingredientes contribuem de forma significativa para o empobrecimento da dieta (Bezerra *et al.* 2016), causam distúrbios severos no funcionamento do trato digestório (Marques *et al.* 2015) e desencadeiam reações alérgicas e narcóticas, principalmente nas crianças (Xu *et al.* 2014). Ainda, peritos da área de segurança alimentar declaram

1. Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros Universidade Federal do Piauí. Picos, Piauí, Brasil.

2. Docente do Curso de Ciências Biológicas do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros Universidade Federal do Piauí. Rua Cicero Duarte 905, Bairro Junco, CEP 64607-670, Picos, Piauí, Brasil.

3. Docente do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do Campus Ministro Petrônio Portella. Teresina, Piauí, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [anapaulaperon@ufpi.edu.br](mailto:anapaulaperon@ufpi.edu.br)

que os aditivos de aroma e sabor, com ênfase aos sintéticos, suscitam uma série de dúvidas quanto aos seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (Moura *et al.* 2016), uma vez que, estudos toxigenéticos de tais substâncias são praticamente inexistentes na literatura científica (Konishi *et al.* 2011, Koca *et al.* 2015). Em razão desta carência de informações, os órgãos de vigilância alimentar, até o presente momento, ainda não possuem estabelecidos em documento os índices de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para estes aditivos (Zequin *et al.* 2011, More *et al.* 2012).

É de conhecimento que compostos citotóxicos e/ou genotóxicos têm o potencial de alterar mecanismos celulares vitais, como a duplicação e a transcrição gênica, e promover alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas (Marques *et al.* 2015, Santana *et al.* 2016). Estas alterações podem comprometer significativamente a divisão celular do tecido ou órgão afetado e desencadear e/ou potencializar processos cancerosos (Valavanidis *et al.* 2013). De acordo com Louzada *et al.* (2015), o desenvolvimento dos tipos mais comuns de câncer resulta da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável deles a dieta alimentar, principalmente quando constituída de alimentos industrializados em demasia. Estes autores ainda citam que mais de 40% dos diversos tipos de câncer são iniciados ou potencializados em virtude de dietas inadequadas ricas em aditivos alimentares sintéticos.

As células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. (cebola) são eficientes bioensaios para o *screening* inicial de toxicidade aguda em nível celular em função de oferecerem excelentes propriedades cinéticas de proliferação, cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ) o que facilita a detecção de alterações cromossômicas e de fuso mitótico (Türkoğlu, 2007, Herrero *et al.* 2011). Ainda, permite a verificação de alterações no índice de divisão celular ou mitótico quando exposto a compostos químicos com potencial ação citotóxica, e apresenta, em grande parte das vezes, similaridade satisfatória aos resultados obtidos a partir de outros bioensaios (Herrero *et al.* 2011, Tabrez *et al.* 2011).

Portanto, considerando o contexto abordado, objetivou-se avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de aditivos aromatizantes sintéticos artificiais de Biscoito e Baunilha associados entre si. Estes aromatizantes em associação são amplamente utilizados na indústria alimentícia na confecção de bolachas recheadas, bolos e cookies industrializados, entre outros alimentos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os aditivos de aroma e sabor, dos tipos sintéticos artificiais, de Baunilha e Biscoito foram obtidos de uma indústria de fabricação de microingredientes alimentares localizada na cidade de Recife, Estado de Pernambuco - Brasil, especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos. No rótulo dos dois aditivos sugeria-se a utilização de 3 mL

de aromatizante para 1,0 kg de massa. Os bulbos de cebolas selecionados para este experimento pesaram, em média, 200 g. Assim, de forma proporcional ao recomendado nos frascos dos microingredientes, definiu-se inicialmente para cada aromatizante a dose de 0,6 mL, e a partir dela estabeleceu-se duas outras, 0,3 e 0,9 mL. Avaliou-se os dois aromatizantes associados entre si, da seguinte forma: para cada dose estabelecida para estudo do aromatizante de Biscoito agregou-se a mesma dose do aditivo de Baunilha.

Para a realização das análises, os bulbos de cebola foram postos em frascos aerados com água destilada, à temperatura ambiente ( $\pm 27^\circ\text{C}$ ), até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento. Para cada tratamento em associação estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com os seus respectivos tratamentos, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em suas respectivas soluções por 24 horas, procedimento denominado de tempo de exposição 24 horas. Após este tempo foram retiradas algumas raízes e fixadas. Feito este procedimento, as raízes restantes de cada cebola foram devolvidas aos seus respectivos tratamentos onde permaneceram por mais 24 horas, o que se denominou de tempo de exposição 48 horas. Após este período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. A fixação das raízes se deu em fixador de Farmer (etanol e ácido acético; 3:1) por 24 horas. Em cada coleta, retirou-se, em média, três raízes por bulbo.

As lâminas, em média três por bulbo, foram preparadas seguindo o protocolo proposto por Guerra & Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para cada bulbo analisou-se 1.000 células. Todo tratamento em associação foi constituído de três grupos experimentais, o controle, tempo de exposição 24 horas e tempo de exposição 48 horas, e para cada grupo analisou-se um total de 5.000 células. Em cada grupo foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase para a determinação do índice de divisão celular ou índice mitótico. Avaliou-se também a ação dos tratamentos com base na frequência de alterações celulares, como as ocasionadas pelo não alinhamento correto dos cromossomos na placa equatorial e as decorrentes do atraso de cromossomos durante a movimentação ocasionada pelas fibras do fuso mitótico, entre outros distúrbios celulares. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste estatístico Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 5%, por meio do programa BioEstat 4.0 (Ayres *et al.* 2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados na tabela 1, verificou-se para todos os tratamentos avaliados (0,3 mL + 0,3 mL; 0,6 mL + 0,6 mL e 0,9 mL + 0,9 mL), que os índices mitóticos obtidos para os tempos de exposição 24 e 48 horas foram significativamente menores que os índices de divisão celular observados para os seus respectivos controles. Porém, quando comparados os

**Tabela 1.** Número de células em cada fase do ciclo celular, tipos de alterações celulares, médias e desvio padrão dos índices mitóticos e da frequência de alterações observados a partir da exposição da região meristemática de raízes de *A. cepa*, por 24 e 48 horas, em água e em aromatizantes alimentares sintéticos artificiais de Biscoito e Baunilha, nas doses de 0,3, 0,6 e 0,9 mL, associados entre si. Para um mesmo tratamento, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste  $\chi^2$ .

AROMATIZANTE DE BISCOITO + AROMATIZANTE DE BAUNILHA								
Doses associadas (mL)	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
0,3 + 0,3	CO	3971	321	89	221	198	1029	20,6±2,12 <sup>a</sup>
	24h	4659	98	91	79	73	341	6,8 ± 0,21 <sup>b</sup>
	48h	4706	74	82	51	87	294	5,9 ± 0,17 <sup>b</sup>
0,6 + 0,6	CO	3807	422	279	291	201	1193	23,9 ± 1,77 <sup>a</sup>
	24h	4677	184	177	71	68	323	6,5 ± 0,52 <sup>b</sup>
	48h	4665	99	97	81	58	335	6,7 ± 0,30 <sup>b</sup>
0,9 + 0,9	CO	3964	329	314	293	200	1036	20,7 ± 1,22 <sup>a</sup>
	24h	4638	99	99	93	71	362	7,2 ± 0,41 <sup>b</sup>
	48h	4669	111	92	87	41	331	6,6 ± 0,40 <sup>b</sup>
	TE	MC	PA	PT	MN	CB	MP	FAC
0,3 + 0,3	CO	01	00	00	00	00	00	01 ± 0 <sup>a</sup>
	24h	17	08	13	29	07	00	74 ± 6,08 <sup>b</sup>
	48h	12	19	11	21	09	00	72 ± 7,20 <sup>b</sup>
0,6 + 0,6	CO	01	00	00	00	00	00	01 ± 0 <sup>a</sup>
	24h	22	25	29	42	00	01	118 ± 4,47 <sup>b</sup>
	48h	31	21	19	58	01	01	121 ± 2,54 <sup>b</sup>
0,9 + 0,9	CO	00	01	00	00	00	00	01 ± 0 <sup>a</sup>
	24h	22	28	11	83	04	10	158 ± 5,06 <sup>b</sup>
	48h	18	35	21	77	09	00	160 ± 4,08 <sup>b</sup>

Abreviaturas: TCII, Total de células em interfase e de células indiferenciadas; TE, Tempo de Exposição; CO, Controle; TCII, Total de Células em Interfase e Indiferenciadas; P, Profase; M, Metáfase; A, Anáfase; T, Telófase; IM, Índice Mitótico; TCD, Total de células em Divisão; MC, metáfase colchicínica; PA, ponte anáfásica; PT, ponte telofásica; MN, micronúcleo; CB, célula binucleada; MP, metáfase poliploide; FAC, frequência de alterações celulares.

índices de divisão celular referentes ao tempo de exposição 24 h dos três tratamentos em análise com os seus específicos índices mitóticos para o tempo de exposição 48 h, observou-se que não foram significativamente diferentes entre si. Ainda, os tratamentos em associação, nos dois tempos de exposição considerados, induziram frequência significativa de alterações celulares as células das raízes estudadas. Neste estudo, as alterações celulares



**Figura 1.** Alterações de fuso mitótico, representadas aqui por metáfase colchicínica e ponte anáfásica, em tecido meristemático de raízes de *Allium cepa*, expostos a aromatizantes alimentares de Biscoito e Baunilha associados entre si.

foram representadas pelas metáfases colchicínica e pontes anafásicas (Fig. 1), pelas pontes telofásicas, células binucleadas e metáfases poliploides, micronúcleos.

Os resultados de proliferação celular, assim como os de alterações de fuso mitótico, são atestados pelos desvios padrões obtidos em cada tratamento (Tab. 1). Nesta tabela verificou-se que a variação das médias para os índices mitóticos e para a frequência de alterações celulares nos tempos de análise 24 e 48 horas de um mesmo tratamento foi estatisticamente significativa em relação ao desvio observado para os seus respectivos controles, e não significativa quando comparada entre seus específicos tempos de exposição.

Gomes *et al.* (2013) citam que a redução do índice mitótico ocasionada por compostos químicos em linhagens de células normais promove o mal funcionamento de um tecido em função de não permitir ou limitara reposição de células, alterar a produção de proteínas e, consequentemente, resultar no mal funcionamento do órgão onde está localizado. Aissa *et al.* (2012) citam que a redução da proliferação celular ocasionada por compostos químicos, como a observada neste estudo, pode ocorrer em razão de desarranjos, que quando em frequência significativa causam instabilidade nuclear por formar fragmentos acêntricos e/ou promover a perda de cromossomos inteiros ao final da mitose, dando origem aos micronúcleos. Também podem acarretar a má distribuição dos cromossomos na placa equatorial, originando as metáfases colchicínica, e ocasionar retardo na migração de cromossomos inteiros para os polos celulares, formando as pontes anafásicas e/ou telofásicas e/ou a células binucleadas. Os desarranjos

celulares mencionados ocorreram em presença significativa nos meristemas de raízes tratados com as doses de Biscoito e Baunilha em associação (Tab. 1).

Apesar de serem poucos os estudos disponibilizados sobre a toxicidade dos aromatizantes alimentares em nível celular, são encontrados na literatura científica trabalhos de avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade de alguns dos constituintes químicos das classes de diluentes e conservantes presentes nesses microingredientes, compostos estes permitidos e citados nos documentos técnicos das agências de segurança alimentar (Marques *et al.* 2015, Santana *et al.* 2016).

Entre estes compostos está o álcool benzoico, diluente responsável por manter a uniformidade e facilitar a incorporação e dispersão de aromas concentrados nos produtos alimentícios. Em análise a ação em nível celular deste composto químico, Demir *et al.* (2010) verificaram que tal composto promoveu danos significativos ao fuso mitótico de células de sangue periférico humano. Ainda, More *et al.* (2012) verificaram que o diluente diacetil teve o potencial de substituir bases de timina por guaninas em regiões de eucromatina e ocasionar o rompimento de pontes de hidrogênio e de dissulfeto em estrutura terciária de enzimas envolvidas no processo de divisão celular. Já entre os conservantes presentes em aromatizantes alimentares, estão o ácido bórico, ácido cítrico, citrato de potássio e citrato de sódio (Brasil, 2007) que, de acordo Tükoğlu (2007), acarretaram redução significativa da divisão celular dos meristemas de raízes de *A. cepa*, mostrando-se citotóxicos a este sistema teste. Os resultados obtidos por Tükoğlu (2007), Demir *et al.* (2010) e More *et al.* (2012) corroboram aos resultados observados de inibição da proliferação celular ocasionados pela ação dos tratamentos com os aromatizantes de Biscoito e Baunilha em associação.

Leme e Marin-Morales (2008) ressaltam que a presença expressiva de alterações de fuso mitótico, como as desencadeadas aqui pelos aditivos de Biscoito e Baunilha em combinação, são consideradas um importante parâmetro de citotoxicidade e genotoxicidade de compostos ou substâncias de interesse. Dessa forma, os dados obtidos no presente estudo demonstram que os aromatizantes em associação aqui avaliados tem significativo potencial toxigenético e, portanto, devem ser também avaliados em bioensaios fisiologicamente mais complexo, como em animais, para a verificação dos resultados obtidos em raízes de *A. cepa*, uma vez que, segundo Queiroz *et al.* (2015), as alterações de fuso mitótico observadas nesta pesquisa quando presentes de forma expressiva em tecidos animais têm potencial em promover ou potencializar o desenvolvimento de neoplasias.

Como mencionado anteriormente, não há IDA definidos para aromatizantes alimentares de modo geral. Portanto, os resultados aqui obtidos para os aditivos de Biscoito e Baunilha aliados aos trabalhos de toxicidade em nível celular sobre compostos químicos que integram a composição destes microingredientes de aroma e sabor indicam que o consumo de tais microingredientes deva

ser realizados com precaução. Ainda, os resultados observados em *A. cepa* assim como aqueles já publicados poderão auxiliar as agências regulamentadoras a definirem os IDA para os aromatizantes, com ênfase aos de Biscoito e Baunilha. No entanto, estudos adicionais de avaliação de toxicidade devem ser realizados, visto que, conforme descrito por Brasil (2007), Marques *et al.* (2016) e Sales *et al.* (2016), os órgãos de segurança alimentar, como a ANVISA, em seus documentos técnicos enfatizam que para a definição do IDA para qualquer aditivo alimentar, alimento ou substância é necessário realizar vários testes de toxicidade em nível sistêmico e celular através de diferentes sistemas testes, concentrações e/ou dosagens e períodos de análise.

## CONCLUSÃO

As doses associadas dos aromatizantes alimentares de Biscoito e Baunilha avaliadas demonstraram potencial toxigenético por terem causado aos meristemas de raízes de *A. cepa* significativo efeito citotóxico e genotóxico logo no menor tempo de exposição avaliado.

## REFERÊNCIAS

- AISSA, A.F., BIANCHI, M.L.P., RIBEIRO, J.C., HERNANDES, L.C., FARIA, A.F., MERCADANTE, A.Z. & ANTUNES, L.M.G., 2012. Comparative study of  $\beta$ -carotene and microencapsulated  $\beta$ -carotene: Evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1418-1424.
- AYRES, M., AYRES, M.J., AYRES, D.L. & SANTOS, S.A. 2005. *BioEstat 4.0: aplicações estatística nas áreas de Ciências Biomédicas*. Belém: Sociedade Civil/Instituto de Desenvolvimento Sustentável. 400 p.
- BEZERRA, M. D. S., MALAQUIAS, G. D. S., CASTRO E SOUSA, J. M. D., & PERON, A. P. (2016). Cytotoxic and genotoxic potential of powdered juices. *Food Science and Technology (Campinas)*, (AHEAD), 0-0.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº.05, de 15 de Janeiro de 2007 Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf)>. Acesso em: 12 Abr, 2016.
- DEMIR, E., KOCAOGLU, S. & KAYA, R. 2010. Assessment genotoxic effects of benzyl derivatives by comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1239-1242. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ftc.2010.02.016>>
- GOMES, K. M. S., OLIVEIRA, M. V. G. A. D., CARVALHO, F. R. D. S., MENEZES, C. C., & PERON, A. P. 2013. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatzazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Science and Technology*, 33: 218-223.
- GUERRA, M. & SOUZA, M.J. 2004. *Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto: FUNPEC. 240 p.
- HERRERO, O., MARTÍN, J.P., FREIRE, O.F., LÓPEZ, L.C., PEROPADRE, A. & HAZEN, M.J. 2012. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. *Mutation Research*, 743: 24-34. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.028>>
- KOCA, N.; ERBAY, Z. & KAYMARK-ERTEKIN, F. 2015. Effects of spray-dripping conditions on the chemical, physical and sensory properties of cheese powder. *Journal of Dairy Science*, 98: 2934-2943. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9111>>
- KONISHI, Y., HAYASHI, S.M. & FUKUSHIMA, S. 2011. Regulatory forum opinion piece\*: supporting the need for international harmonization of safety assessments for food flavoring substance. *Toxicologic Pathology*, 42: 949-953. <<http://dx.doi.org/10.1177/0192623313495603>>

- MARQUES, G.S., SILVA, S.I.O., SOUSA, J.M.C., FERREIRA, P.M.P. & PERON AP. 2015. Cytotoxicity and mutagenic potential of liquid synthetic food flavoring evaluated individually and in association. *Food Science and Technology*, 35: 183-188. <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.6596>>
- MORE, S.S.; RAZA, A. & VINCE, R. 2012. The butter flavorant, diacetyl, forms a covalent adduct with 2-deoxyguanosine, uncoils DNA, and leads to cell death. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 3311-3317. <<http://dx.doi.org/10.1021/jf300180e>>
- MOURA, A.G., SANTANA, G.M., FERREIRA, P.M.P., SOUSA, J.M.C. & PERON, A.P., 2016. Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allium cepa* L root meristems. *Brazilian Journal of Biology*, 76: 439-443.
- MPOUNTOUKAS, P., PANTAZAKI, A., KOSTARELI, E., CHRISTODOULOU, P., KARELI, D., POLILIOU, S. & LIALIARIS, T. 2010. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chemical and Toxicology*, 48: 2934-2949. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.030>>
- SANTANA, G. M., DEUS, M. S. M., SOUSA, J. M. C., FERREIRA, P. M. P., FERNANDES, H. B., & PERON, A. P. 2016. Antimitotic and antimutagenic action of the *Hymenaea stigonocarpa* bark on dividing cells. *Brazilian Journal of Biology*, 76(2): 520-525.
- TABREZ, S., SAHKIL, S., UROOJ, M., DAMANHORI, G.A., ABUZENADAH, A.M. & AHMAD, D. 2011. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an over view of the techniques and their efficacies. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 29:250-275. <<http://dx.doi.org/10.1080/10590501.2011.601849>>
- TÜRKOĞLU, Ş. 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research*, 626: 4-14. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.07.006>>
- XU, Z., GU, C., WANG, K., JU, J., WANG, H., RUAN, K. & FENG, Y. 2015. Arctigenic acid, the key substance responsible for the hypoglycemic activity of *Fructus Arctii*. *Phytomedicine*, 22: 128-137. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.11.006>>