

anexo

Este exemplar corresponde a versão final
da tese defendida por Maria Filomena Claret
Fernandes de Aguiar Valim e aprovada pela
Comissão Julgadora em 29.03.89.
Campinas, 29 de março de 1989.

F. R. P.

Presidente da Banca

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Impl.

"AVALIAÇÃO DO EFEITO DE
CORANTES ORGANICOS SINTETICOS ARTIFICIAIS
NA FUNÇÃO RESPIRATORIA MITOCONDRIAL"

Maria Filomena Claret Fernandes de
Aguiar Valim *fl*
Engenheira de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes *fl*

09/89

Tese Apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciências de Alimentos.

Ao MARCOS, pela força e amor de sempre.

A minha FAMILIA - meus pais, Myrthes e Ruy,
e meu irmão, Zé Atilio - pelo apoio,
incentivo e carinho.

Aos meus filhos - GABRIEL e RAFAEL, que
representam minha esperança em um mundo
melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Félix Guillermo Reyes Reyes pela orientação e amizade durante todo o curso de mestrado.

Aos Profs. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi e Dra. Lúcia Pereira da Silva pela orientação e auxílio operacional no trabalho com mitocôndrias isoladas.

A Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares pelo auxílio no estudo histológico dos órgãos dos animais.

Ao Prof. Dr. Djalma de Carvalho Moreira Filho pela valiosa contribuição prestada na análise estatística.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia, Doroti, Magali, Silvana, Mônica, Rosana e Nestor pelo apoio, incentivo e amizade durante estes anos de trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz e a ICI do Brasil S. A. pelo fornecimento dos corantes utilizados neste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, Márcia, Celene, Ione, Valderez que através de diversas maneiras colaboraram neste trabalho e, em especial, à Regina Célia Rosseto pela colaboração técnica.

A Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, ABIA, pela gentileza das cópias desta tese.

A Dinâmica Estruturas Metálicas e Engenharia Ltda, na pessoa de seu diretor Fernando T. Fernandes Alvares Leite, pelo uso do computador para digitação desta tese.

Ao Quico, pela paciência ao ensinar-me a utilizar o microcomputador para a digitação desta tese.

A Citrosuco Paulista S.A., na pessoa de seu diretor Benedito F. Jorge, pela gentileza na utilização do microcomputador para compilação dos resultados experimentais desta tese.

A todos os amigos, aos professores e funcionários da FEA/UNICAMP que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho, em especial à bibliotecária Cleusa pela colaboração na normalização das referências bibliográficas.

INDICE DE TABELAS	i
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMO	vi
SUMMARY	viii
I- INTRODUÇÃO	1
II- REVISAO BIBLIOGRAFICA	3
1- Histórico	3
2- Perfil Toxicológico dos Corantes Orgânicos Sintéticos Artificiais de Uso Permitido em Alimentos no Brasil ..	10
2.1- Corantes Azo	10
2.1.1- Vermelho 40	12
2.1.2- Amarelo Crepúsculo	13
2.1.3- Amarelo de Tartrazina	14
2.1.4- Ponceau 4 R	15
2.1.5- Amarantho	16
2.2- Corantes Indigóides	18
2.2.1- Azul de Indigotina	18
2.3- Corantes Xantenos	19
2.3.1- Vermelho de Eritrosina	19
2.4- Corantes Trifenilmetanos	22
2.4.1- Azul Brilhante	22
3- A Utilização da Mitocôndria como Instrumento de Avaliação Toxicológica	24
3.1- Mitocôndria: Importância e Funções	24
3.2- Síntese de ATP	26

3.3- A Utilização da Mitocôndria em Ensaio	
Toxicológicos	27
III- MATERIAIS E METODOS	30
1- Corantes Utilizados para Avaliação da Função	
Respiratoria Mitochondrial "in vitro"	30
2- Corante Utilizado para Avaliação da Função	
Respiratoria Mitochondrial "in vivo"	31
3- Obtenção das Suspensões Mitochondriais	32
3.1- Mitocôndria de Fígado de Rato	32
3.2- Mitocôndria de Rim de Rato	33
3.3- Dosagem de Proteína	33
4- Efeito dos Corantes Orgânicos Sintéticos Artificiais	
na Função Respiratória Mitochondrial Hepática e Renal	
"in vitro"	33
4.1- Consumo de Oxigênio	33
4.2- Controle Respiratório	36
4.3- Efeito da Concentração do Corante na	
Velocidade Máxima de Respiração	37
5- Efeito da Ingestão de Eritrosina na Função	
Respiratória Mitochondrial "in vivo".....	37
5.1- Condições do Ensaio Toxicológico	37
5.2- Ganho de Peso	39
5.3- Consumo de Corante	39
5.4- Consumo de Ração	39
5.5- Avaliação da Função Respiratória Mitochondrial.	40
6- Avaliação Histológica do Efeito da Ingestão de	
Eritrosina	40

7- Tratamento Estatístico	41
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
1- Efeito dos Corantes Orgânicos Sintéticos Artificiais na Função Respiratória Mitochondrial "in vitro"	42
2- Efeito da Ingestão de Eritrosina em Ratos Wistar	55
2.1- Ganho de Peso	56
2.2- Consumo de Ração e de Corante	60
2.3- Avaliação da Função Respiratória Mitochondrial de Ratos Wistar Submetidos à Ingestão do Corante Eritrosina	63
2.4- Avaliação do Efeito da Ingestão de Corante Eritrosina no Peso de órgãos de ratos Wistar ...	67
2.5- Avaliação Histológica do Efeito da Ingestão de Eritrosina em Ratos Wistar	67
V- CONCLUSÕES	75
VI- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	77

TABELA 1	- Porcentagem de diminuição do controle respiratorio (CR) de mitocôndrias hepáticas por corantes orgânicos sintéticos artificiais na concentração de 0,1 mg corante/ml de meio de reação.....	45
TABELA 2	- Porcentagem de inibição da velocidade respiratória do estado III, desacoplado de mitocôndrias isoladas de fígado e de rim de ratos Wistar por corantes orgânicos sintéticos artificiais na concentração de 0,1 mg corante/ml de meio de reação.....	46
TABELA 3	- Porcentagem de inibição da velocidade respiratória do estado IV de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar por corantes orgânicos sintéticos artificiais na concentração de 0,1 mg corante/ml de meio de reação	47
TABELA 4	- Dose de inibição 50 (DI 50) de corantes orgânicos sintéticos artificiais em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar, na presença de α -cetogluturato e de succinato	53
TABELA 5	- Dose de inibição 50 (DI 50) de corantes orgânicos sintéticos artificiais em mitocôndrias isoladas de rim de ratos Wistar, na presença de succinato.....	54

TABELA 6 - Análise de variância para ganho de peso de ratos Wistar submetidos à ingestão do corante Eritrosina	59
TABELA 7 - Análise de variância para consumo semanal de ração de ratos Wistar submetidos à ingestão do corante Eritrosina.....	62
TABELA 8 - Velocidade de consumo de oxigênio no estado III, desacoplado, na presença de α -cetogluturato e de succinato de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar submetidos à ingestão de Eritrosina	64
TABELA 9 - Análise de variância para velocidade de consumo de oxigênio no estado III desacoplado de mitocôndrias isolada de fígado de ratos Wistar fêmeas submetidos à ingestão de Eritrosina.....	65
TABELA 10 - Análise de variância para velocidade de consumo de oxigênio no estado III desacoplado de mitocôndrias isolada de fígado de ratos Wistar machos submetidos à ingestão de Eritrosina.....	66
TABELA 11 - Peso relativo dos órgãos dos animais submetidos à ingestão de Eritrosina.....	68
TABELA 12 - Análise de variância para peso relativo dos órgãos de ratos Wistar fêmeas submetidos a ingestão de Eritrosina	69

TABELA 13 - Análise de variância para peso relativo dos órgãos de ratos Wistar machos submetidos a ingestão de Eritrosina.....	70
--	----

FIGURA 1	- Estrutura química dos corantes azo de uso permitido em alimentos no Brasil.....	11
FIGURA 2	- Representação esquemática da câmara de vidro utilizada nos ensaios com mitocôndrias isoladas.....	35
FIGURA 3	- Relação dose-resposta de corantes orgânicos sintéticos artificiais na inibição da velocidade máxima de respiração (estado III desacoplado) de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar na presença de α -cetoglutarato.....	50
FIGURA 4	- Relação dose-resposta de corantes orgânicos sintéticos artificiais na inibição da máxima de respiração (estado III desacoplado) de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar na presença de succinato	51
FIGURA 5	- Relação dose-resposta de corantes orgânicos sintéticos artificiais na inibição da velocidade máxima de respiração (estado III desacoplado) de mitocôndrias isoladas de rim de ratos Wistar na presença de succinato	52
FIGURA 6	- Curvas de ganho de peso para ratos Wistar fêmeas submetidos à ingestão de Eritrosina.....	57

FIGURA 7 -	Curvas de ganho de peso para ratos Wistar machos submetidos à ingestão de Eritrosina.....	58
FIGURA 8 -	Curvas de consumo real de corante Eritrosina para ratos Wistar.....	62
FIGURA 9 -	Fotomicrografias de cortes histológicos (coloração Hematoxilina e Eosina) do trato gastrointestinal de ratos submetidos à ingestão de 1000 mg de Eritrosina/kg de peso corpóreo....	73
FIGURA 10 -	Fotomicrografias de cortes histológicos (coloração Hematoxilina e Eosina) das glândulas anexas, do sistema linfocitário e do pulmão de ratos submetidos à ingestão de 1000 mg de Eritrosina/kg de peso corpóreo.....	74

RESUMO

Neste estudo foi realizada a avaliação do efeito, na respiração mitocondrial, dos seguintes corantes orgânicos sintéticos artificiais, de uso permitido em alimentos no Brasil: Eritrosina, Ponceau 4R, Vermelho 40, Amarelo Crepúsculo, Amarelo de Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brilhante e Amaranço, assim como dos corantes: Laranja GGN, Escarlata GN e Vermelho Sólido E.

Utilizando-se mitocôndrias isoladas de fígado e de rim de ratos Wistar, verificou-se que estes corantes inibiam a respiração mitocondrial comprovada pelo decréscimo da velocidade de consumo de oxigênio no estado III, desacoplado.

Após a verificação deste efeito "in vitro", foi selecionado o corante Eritrosina, para a avaliação "in vivo" de seu efeito na função respiratória mitocondrial. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, submetidos durante noventa dias, a diferentes ingestões hídricas contendo Eritrosina nas concentrações de, aproximadamente, 0, 100, 500 e 1000 mg de corante por kg de peso corpóreo médio dos ratos de cada grupo. Não foram verificadas diferenças significativas, a nível de 5%, no ganho de peso dos animais, nem efeitos na sua função respiratória mitocondrial hepática.

Ao término do estudo de 90 dias, foi procedida uma avaliação anatomo-histológica dos sistemas digestivo, respiratório, urinário e linfóide, sendo os tecidos fixados e preparados histologicamente segundo técnicas de rotina. O exame anatomico

dos órgãos não demonstrou alteração significativa, com exceção da dilatação do ceco dos animais que ingeriram Eritrosina, independente da dose. A observação dos órgãos ao Microscópio Óptico não revelou ocorrência de anomalias.

Com exceção do baço, não foi verificada diferença estatisticamente significativa, à nível de 5%, no peso relativo dos órgãos estudados: fígado, rins e bexiga.

SUMMARY

Eleven organic synthetic dyes currently or formerly permitted as food colors in Brasil were tested to determine their effect on mitochondrial respiratory function using mitochondria isolated from rat liver and kidney.

It was verified that these dyes inhibit the mitochondrial respiration by affecting the oxygen uptake rate on state III, in the presence of both α -ketoglutarate and succinate.

Erythrosine was selected to investigate this effect "in vivo". For this purpose, the compound was administrated, on the water, to Wistar rats, male and female, during ninety days at dose levels of, approximately, 0, 100, 500 and 1000 mg/kg b.w.

No significative difference was observed on body weight gain and no effect was found on the hepatic mitochondrial respiratory function of the animals.

At the end of the sub-chronic study macroscopic examination of the following animals systems was performed: digestive, respiratory, urinary and linfoid. The only abnormality observed was enlargement of the caecum of those animals submitted to ingestion of Erythrosine.

The organs were also submitted to histological examination according to routine procedures, and their observation at the Optic Microscope revealed no tissular abnormalities.

With exception of the spleen of the male rats, no significative difference, at 5% level, was found on the relative organs weight studied (liver, kidneys and bladder).

I- INTRODUÇÃO

A utilização de corantes em alimentos é um hábito antigo e através da história tem exercido um papel importante tanto pela sua influência nas propriedades gustativas do alimento, quanto na sua aceitabilidade e identificação pelo consumidor.

Sob o ponto de vista tecnológico, justifica-se a adição de corantes aos alimentos cuja coloração natural foi afetada ou destruída por tratamento térmico ou por conservantes adicionados durante seu processamento. Estes compostos exercem também um importante papel para que se atinja uma uniformidade na produção de alimentos em larga escala de origem diversa quanto à região geográfica, condições climáticas, solos e estações do ano.

Por todas estas razões, tem-se observado ao longo deste século, um aumento no número de corantes sintéticos disponíveis à indústria alimentícia.

Embora estes novos compostos venham sendo utilizados em grande variedade de produtos há vários anos, comparativamente poucos trabalhos sobre sua toxicidade e metabolismo foram publicados até os anos sessenta. Entretanto, a crescente preocupação com os possíveis danos à saúde humana associados à utilização destes compostos tem, recentemente, dirigido a atenção dos pesquisadores a um melhor e mais detalhado estudo de sua atividade biológica.

Historicamente, o objeto inicial de pesquisas foram os efeitos tóxicos agudos e os estudos de toxicidade à curto prazo. Seguiram-se a estes, maiores interesses em toxicidade crônica e em consequência, estudos sobre carcinogenicidade, teratogenicidade potencial e efeitos na reprodução.

Todos estes testes são realizados através da administração dos corantes à animais de várias espécies e os dados sobre a toxicidade do composto são obtidos de estudos histopatológicos dos órgãos do animal e da avaliação de parâmetros bioquímicos.

Uma vez que estas substâncias são metabolizadas principalmente no fígado pelo sistema microsossomal hepático, estudos de possível toxicidade a este órgão e suas organelas são de grande importancia.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo de possíveis efeitos tóxicos de corantes orgânicos sintéticos artificiais à mitocôndrias hepáticas, organelas que exercem papel importante na célula por mediar funções metabólicas essenciais à vida celular. Para avaliar o efeito tóxico dos corantes às mitocôndrias hepáticas, foi utilizado como parâmetro a função respiratória mitocondrial.

Inicialmente foram realizados estudos "in vitro" utilizando-se preparações mitocondriais isoladas de fígado e de rim de ratos Wistar. Numa segunda etapa, dentre os compostos que apresentaram efeito inibitório na função respiratória, foi selecionado o corante Eritrosina e realizada a avaliação "in vivo" (estudo de toxicidade sub-crônica) da função respiratória mitocondrial, utilizando-se ratos Wistar.

Paralelamente, foi efetuado estudo anatomohistológico dos seguintes órgãos: estômago, fígado, baço, intestino, rins e bexiga, a fim de verificar possíveis efeitos adversos à estes órgãos devido à ingestão do corante Eritrosina.

II- REVISAO BIBLIOGRAFICA

1- Histórico

Adicionar corantes aos alimentos para torná-los mais atrativos não é invenção moderna. Civilizações antigas extraíam substâncias de ocorrência natural em plantas, minerais e animais para utilizá-las na coloração de seus alimentos.

Entretanto, iniciou-se no século XVIII, e ganhou impulso no século XIX com a descoberta dos corantes sintéticos, uma exploração do valor dos corantes para a venda de alimentos de má qualidade ou até mesmo deteriorados. Vários alimentos como vinhos, picles, queijos e doces sofreram estes abusos, devendo sua coloração a sais de cobre, chumbo e outros metais pesados altamente tóxicos (IFT, 1980).

Em 1856, na Inglaterra, foi sintetizado o primeiro corante de uma classe que passou a ser conhecida como derivados da hulha. Estes corantes apresentavam maior uniformidade, estabilidade e poder de coloração em relação às substâncias utilizadas anteriormente, estimulando assim novas descobertas (IFT, 1980).

Devido à proliferação de compostos corantes sintéticos e de seu uso estendido aos alimentos, tornou-se necessário o controle de suas aplicações e desenvolveu-se maior preocupação com seus possíveis efeitos à saúde humana.

Dentro deste contexto, foi promulgada na Inglaterra, em 1860, uma lei para controlar a qualidade dos alimentos, sendo este procedimento seguido por vários países europeus durante os anos que se seguiram (IFT, 1986).

Nos Estados Unidos, em 1886, foi permitida a adição de corante na manteiga, e a seguir, foi adotado também seu uso em

queijos. No começo do século, uma vez que os corantes podiam também ser utilizados em geléias, xaropes, sorvetes, doces e massas, o Departamento de Agricultura destinou fundos para que se investigasse o uso apropriado e seguro dos corantes existentes. Os testes realizados consistiram de provas laboratoriais de resposta fisiológica à curto prazo em coelhos e cães. Dentre os compostos então aprovados, apenas dois, Eritrosina e Indigotina, são ainda permitidos para uso em alimentos nos Estados Unidos (IFT, 1986).

Até 1980, os corantes utilizados em alimentos em todo o mundo estavam limitados a trinta e seis substâncias sintéticas orgânicas (não encontradas na natureza) e vinte e cinco grupos de substâncias naturais (neste grupo estão incluídas aquelas substâncias sintéticas idênticas às encontradas na natureza). Estes vinte e cinco grupos podem ser expandidos a cinquenta substâncias se listarmos individualmente carotenóides e xantofilas (Coulson, 1982).

Devido ao grande número de substâncias, a lista dos corantes permitidos em cada país varia substancialmente. Numa tentativa de criar uma harmonização destas listas à nível mundial, foram criadas organizações internacionais encarregadas de estabelecer especificações e critérios para a avaliação toxicológica dos aditivos utilizados em alimentos.

Dentre estas organizações, podemos destacar o Comité Conjunto da Organização de Agricultura e Alimentos (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) de Peritos em Aditivos para Alimentos - JECFA - . Este Comité tem elaborado desde sua criação, em 1956, uma série de monografias e boletins técnicos

contendo a avaliação toxicológica de aditivos e contaminantes de alimentos, assim como princípios para esta avaliação.

As recomendações do JECFA estão vinculadas a definição da ingestão diária aceitável (IDA). A IDA é definida pelo Comitê como a quantidade de um aditivo alimentar, expressa com base no peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente durante toda a vida sem oferecer risco apreciável à saúde (FAO/WHO, 1987). Esta IDA é atribuída somente àquelas substâncias para as quais os dados toxicológicos disponíveis incluem os resultados de estudos de toxicidade à curto e longo prazo e/ou informações bioquímicas satisfatórias e percurso metabólico do composto.

O Comitê pode ainda atribuir para os aditivos alimentares uma IDA temporária ou uma IDA não especificada, definidas da seguinte maneira:

- IDA temporária: é atribuída àquelas substâncias para as quais dentro de um determinado período de tempo devem ser providenciadas informações adicionais. Indica que os dados toxicológicos disponíveis são adequados para assegurar o uso seguro do aditivo durante o tempo ao qual se aplica a IDA temporária, mas insuficientes para concluir que o uso da substância é seguro durante toda a vida. Se os dados requeridos não forem apresentados no tempo estabelecido, a IDA temporária será retirada. Quando se estabelece a IDA temporária utiliza-se um fator de segurança maior que o usual.

- IDA não especificada: é atribuída àquelas substâncias de baixa toxicidade para as quais não se estabelece um limite de ingestão. São substâncias constituintes dos alimentos ou que podem ser

consideradas como metabólito normal do homem. Apesar de não existir limite para a utilização destas substâncias, elas devem ser utilizadas dentro das normas da boa prática tecnológica, isto é, ser tecnologicamente eficiente e utilizada na menor quantidade necessária para atingir seu efeito.

O JECFA não atribui IDA às substâncias para as quais os dados toxicológicos disponíveis, assim como, as informações sobre seu uso tecnológico forem insuficientes ou ainda, quando as especificações sobre sua pureza e identidade não forem estabelecidas (FAO/WHO, 1987).

Com o objetivo de harmonizar o intercâmbio comercial de alimentos, foi criado em 1962, a Comissão do Codex Alimentarius, que é um organismo subsidiário da FAO e da OMS. Até o final de 1987, cento e trinta países membros da Organização das Nações Unidas (ONU) estavam representados na Comissão do Codex Alimentarius. Cabe ao governo destes países escolher seus representantes que tomarão parte nos diversos comitês da Comissão do Codex Alimentarius. Dentre estes, destacamos o Comitê de Aditivos Alimentares (CCFA), cuja função é estabelecer quais aditivos podem ser utilizados e em que quantidade, tendo em consideração as necessidades tecnológicas e o uso seguro destas substâncias. Dentro deste trabalho de avaliação a CCFA leva em consideração as informações fornecidas pelo JECFA. Todavia, para implementar as recomendações feitas pelo Codex Alimentarius as mesmas devem ser referendadas pelos respectivos governos de cada um dos países membros.

Existem ainda, em âmbito internacional, o Centro Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) da Organização

Mundial da Saúde, que avalia o risco de carcinogenicidade de substâncias químicas para o homem, e o Comitê Científico para Alimentos (SCF) da Comunidade Económica Europeia (CEE). As deliberações do SCF/CEE incluem um posicionamento sobre a inocuidade dos aditivos alimentares, sendo influenciadas pela legislação de cada país. São também efetuadas revisões considerando-se novas evidências com respeito a segurança dos compostos e seus usos. Seu objetivo é facilitar as operações comerciais entre os países membros da Comunidade Económica Europeia.

Nos Estados Unidos, a responsabilidade de avaliar dados e informações disponíveis de aditivos a serem utilizados em alimentos e a decisão quanto ao seu uso, estão a cargo da Administração para Alimentos e Drogas (FDA). Estudos crônicos realizados com a administração de corantes a animais, principalmente ratos, foram conduzidos nos laboratórios da FDA nos anos cinquenta, assim como estudos adicionais foram realizados em outros laboratórios nos anos sessenta. Apesar destes estudos terem sido revisados e aprovados pelo próprio FDA em 1968-1969, alguns anos mais tarde, de acordo com protocolos mais elaborados devido ao avanço dos conhecimentos toxicológicos, estes estudos foram considerados insatisfatórios e novos dados foram requisitados.

Em 1982, o FDA estabeleceu o seguinte protocolo para testes toxicológicos de novas substâncias corantes:

1- Estudo de administração subcrônica do composto durante 90 dias em uma espécie não-roedora, usualmente cachorros.

- 2- Estudo de toxicidade aguda em ratos.
- 3- Estudo de toxicidade crônica durante 24-30 meses em pelo menos duas espécies animais, por exemplo, ratos e camundongos.
- 4- Um estudo teratológico.
- 5- Um estudo sobre efeitos na reprodução utilizando camundongos.
- 6- Um teste de mutagenicidade.

Nos Estados Unidos, os corantes são utilizados em alimentos em quantidades suficientes para produzir seu efeito, ou seja, dentro das boas práticas tecnológicas. O uso excessivo destas substâncias é raramente um problema, uma vez que isto resultaria em um aumento dos custos de produção do alimento e num produto com aspecto não natural (IFT, 1986).

Na Inglaterra, a primeira legislação relativa à aditivos alimentares promulgada em 1860, foi revista e modernizada em 1955. Detalhes relativos à corantes alimentares foram anexados em 1973 (Berdick, 1982).

No Japão, uma lei de 1947 regula o uso de corantes em alimentos. A Alemanha baseia seu controle do emprego de corantes no trabalho realizado em 1959 pela Comissão Alemã de Corantes, havendo ainda a legislação de alimentos de 1974 (Berdick, 1982).

No Brasil, foi promulgado pela primeira vez em 1961 um decreto referente à normas reguladoras do emprego de aditivos em alimentos. Este decreto de no. 50040 foi a seguir alterado em março de 1962. Atualmente, a decisão sobre o uso de corantes em alimentos cabe a Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL) da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, órgãos subordinados ao Ministério da Saúde (Brasil, 1961).

A legislação atual sobre o emprego de aditivos em alimentos

consta do decreto no. 55871 de 1965, o qual, recentemente, em 28/01/87, foi modificado através de uma portaria pela qual passaram a ser permitidos unicamente os seguintes compostos: Vermelho de Eritrosina, Vermelho 40, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo de Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brilhante e Amaranto. Considerando que as informações toxicológicas são insuficientes para uma avaliação do grau de risco toxicológico especialmente quanto ao metabolismo, efeitos sobre a reprodução, embriotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade, os seguintes compostos foram excluídos: Amarelo Acido ou Amarelo Sólido, Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina, Laranja GGN, Vermelho Sólido E e Escarlata GN. (Brasil, 1965; 1988).

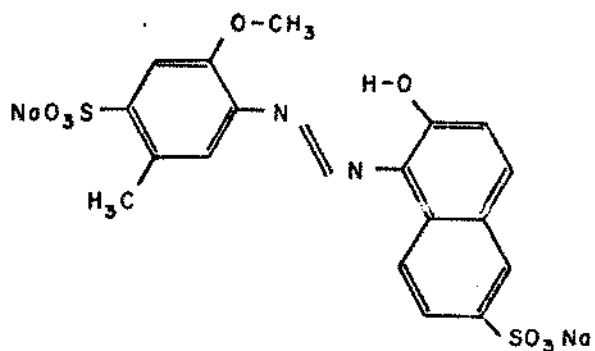
2- Perfil Toxicológico dos Corantes Orgânicos Sintéticos Artificiais de uso Permitido em Alimentos no Brasil

2.1- Corantes Azo

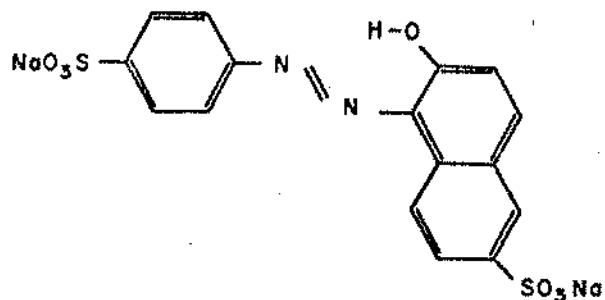
Esta classe de corantes compreende vários compostos constituídos basicamente de um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzênico por uma ligação azo ($N=N$). Estes anéis podem conter um, dois ou três grupos sulfônicos (Drake, 1975). Na figura 1, estão apresentadas as estruturas químicas dos corantes azo de uso permitido em alimentos no Brasil.

Apesar destes compostos formarem o mais importante grupo de corantes sintéticos utilizados em alimentos, cosméticos e medicamentos, poucos estudos relevantes sobre sua toxicidade foram realizados até o início dos anos sessenta. Desde então, estudos toxicológicos comprovaram que seu metabolismo, constituído principalmente pela clivagem da ligação azo ($N=N$), pode ser mediado pela flora bacteriana presente no intestino ou se realizar no fígado quando a enzima azoredutase for induzida.

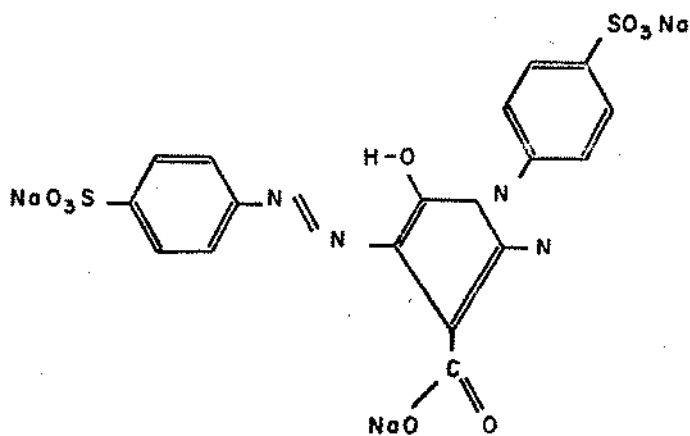
Estes dois percursos metabólicos fornecem produtos de redução do composto original que podem estar ligados as respostas tóxicas a estes corantes. Entretanto, para um maior avanço na compreensão dos efeitos toxicológicos destes compostos são necessários estudos individuais do metabolismo de cada corante, pois, assim como relatado por Walker em 1970, ainda não existe um modelo teórico confiável para estabelecer uma correlação entre as propriedades biológicas dos corantes azo e sua estrutura química (Walker, 1970).



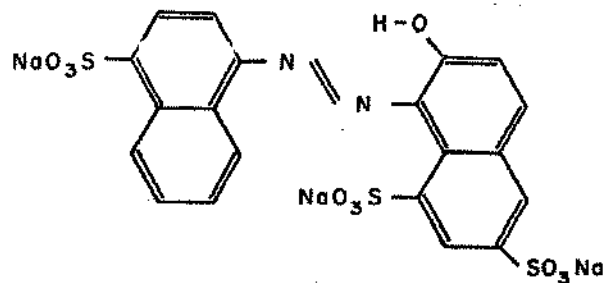
VERMELHO 40



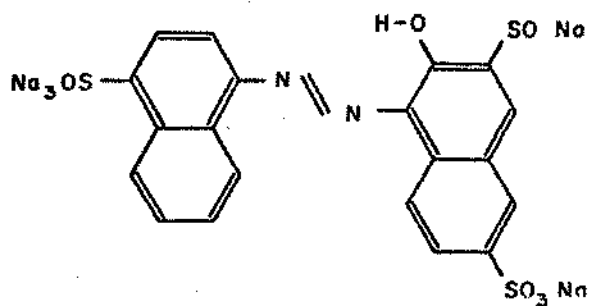
AMARELO CREPUSCULO



AMARELO DE TARTRAZINA



PONCEAU 4R



AMARANTO

FIGURA 1 - Estrutura química dos corantes azo de uso permitido em alimentos no Brasil.

2.1.1- Vermelho 40

Este corante monoazoico foi desenvolvido para uso em alimentos em 1967 e, em 1974, o FDA concedeu sua aprovação para o uso deste corante em alimentos e medicamentos. Neste mesmo ano, o Canadá rejeitou a aprovação para o uso deste corante em alimentos, considerando que os dados toxicológicos apresentados pelo fabricante do composto eram insuficientes para estabelecer seu uso seguro (IFT, 1986; Berdick, 1982).

Atualmente, com base em estudos adicionais apresentados após 1974, o Vermelho 40 foi aprovado para uso em alimentos no Canadá. Entretanto, este corante não é permitido para uso em alimentos na Inglaterra, Suíça, Holanda, Suécia, assim como nos países pertencentes a Comunidade Econômica Européia (IFT, 1986).

Estudos de toxicidade crônica realizados em ratos não mostraram efeitos adversos, excepto por moderada redução no ganho de peso dos animais do grupo de maior dosagem. Este estudo, entretanto, foi considerado inadequado pois, devido a baixa taxa de sobrevivência, poucos animais foram examinados ao final do período teste (Vettorazzi, 1981).

Em sua primeira avaliação deste corante, em 1974, o JECFA não estabeleceu uma IDA devido a ausência de estudos sobre seu metabolismo. Posteriormente, em 1980, este corante foi reavaliado e estudos metabólicos mostraram que o Vermelho 40 é fracamente absorvido pelo organismo e que sua via importante mais de excreção é pelas fezes. Vários estudos sobre sua mutagenicidade e estudos de toxicidade à longo prazo sugeriram que este corante não possui potencial carcinogênico. Com base nestes dados, o

JECFA estabeleceu uma IDA temporária, até 1981, de 0 - 7 mg/kg p.c.. Após avaliação de novos dados submetidos ao Comitê a respeito da análise estatística dos estudos à longo prazo em camundongos, o caráter temporário foi retirado (FAO/WHO, 1981; Berdick, 1982).

2.1.2- Amarelo Crepúsculo

Este corante monoazoico foi sintetizado pela primeira vez em 1878. Em 1972, era fabricado nos Estados Unidos, Europa Ocidental e Japão e sua utilização, numa grande variedade de alimentos, cosméticos e medicamentos, era aprovada em quase todos os países nos cinco continentes (Vettorazzi, 1981)

Na avaliação deste corante feita pelo JECFA em 1964, foi estabelecida uma IDA de 0 - 5 mg/kg p.c. Após esta avaliação, vários estudos de toxicidade à longo prazo foram conduzidos em ratos, camundongos, hamsters e cachorros. Estudos bioquímicos realizados em ratos indicaram que este corante sofre redução na ligação azo pela ação de bactérias presentes no intestino e alguns compostos resultantes são absorvidos e depois excretados na urina (Vettorazzi, 1981).

Na reunião de 1982, o JECFA reavaliou os estudos iniciais, juntamente com novos disponíveis sobre o Amarelo Crepúsculo tendo estabelecido uma IDA de 0 - 2,5 mg/kg p.c. . Nessa ocasião foi publicada uma monografia contendo dados bioquímicos e de toxicidade à curto e longo prazo além de estudos de teratogenicidade e mutagenicidade (FAO/WHO, 1982).

O Amarelo Crepúsculo tem sido utilizado nos Estados Unidos desde 1929, em alimentos e medicamentos, sendo que, até 1986, figurava na lista dos compostos permitidos em caráter temporário. Em 1985, por solicitação do FDA, o "National Toxicology Program" avaliou os dados toxicológicos existentes sobre o Amarelo Crepúsculo tendo concluído que este composto não possui propriedades carcinogênicas (IFT, 1986). Este corante é também utilizado no Canadá, nos países da Comunidade Económica Europeia, na Inglaterra e no Japão (Berdick, 1982).

2.1.3- Amarelo de Tartrazina

A Tartrazina pertence a classe dos corantes azopirrazolônicos e é utilizada em alimentos, medicamentos e cosméticos. Em 1964, nos laboratórios do FDA, foram realizados estudos administrando este corante na dieta de ratos e cachorros, durante dois anos. Através destes estudos, o composto foi considerado de uso seguro para alimentos tendo sido estabelecida uma IDA de 0 - 5 mg/kg p.c. (Berdick, 1982).

Mais recentemente, entretanto, o corante Tartrazina tem sido associado à reações alérgicas em seres humanos causando desde urticárias até asma. Tem sido também demonstradas correlações entre sensibilidade à Tartrazina e intolerância a aspirina (ácido acetilsalicílico) (Lockey, 1977; Nain, 1983).

Devido a esta relação com reações alérgicas em indivíduos sensíveis, os órgãos de regulamentação tem restringido o uso deste corante e obrigado sua declaração nominal nos rótulos dos alimentos, como acontece nos Estados Unidos desde 1979 (IFT, 1986).

O Amarelo de Tartrazina tem seu uso aprovado em alimentos em aproximadamente sessenta países como: Estados Unidos, Canadá, Japão, Inglaterra, e nos países da Comunidade Economica Europeia (Berdick, 1982).

Na reunião de 1964, o JECFA estabeleceu uma IDA de 0 - 7,5 mg/kg p.c. para a Tartrazina, adotando também especificações para o composto. Até o presente, esta IDA se mantém válida.

2.1.4- Ponceau 4 R

Este corante foi avaliado pelo JECFA em 1964, 1969, 1974, 1978, 1981 e 1983. Na primeira avaliação efetuada em 1964, foi estabelecida uma IDA temporária de 0 - 0,75 mg/kg p.c. que, posteriormente, em 1974, foi reduzida para 0 - 0,125 mg/kg p.c., tendo sido sugerida a realização de estudos metabólicos e de efeitos na reprodução (Vettorazzi, 1981; Berdick, 1982).

Em 1982, estudos realizados em ratos por Phillips e col., mostraram que, a exemplo do que ocorre com os corantes Amaranto e Azorubina, grande parte da dose administrada por via oral é rapidamente excretada na urina e, preferencialmente, nas fezes. Os autores sugeriram que o percurso metabólico do Ponceau 4 R no rato é similar a outros corantes azo de estrutura semelhante, sendo o composto reduzido no trato gastrointestinal.

Estudos realizados sobre efeitos na reprodução (3 gerações) não demonstraram efeitos que pudessem ser associados com a injeção do composto, o mesmo ocorrendo com respeito à efeitos teratogênicos e mutagênicos. Com base nestes estudos, submetidos ao JECFA por ocasião da última avaliação do Ponceau 4 R em 1983, o Comitê estabeleceu uma IDA de 0 - 4 mg/kg p.c. (FAO/WHO, 1983).

Este corante tem seu uso permitido em alimentos no Reino Unido e nos países da Comunidade Economica Europeia (Berdick, 1982).

2.1.5- Amaranto

Durante os anos setenta, o corante Amaranto foi alvo de muita controversia acerca de sua toxicidade potencial. Efeitos embriotoxicos e na reprodução e estudos sobre sua carcinogenicidade realizados por pesquisadores russos, em 1970, colocaram em dúvida a segurança do uso deste composto em alimentos e medicamentos. Outros estudos realizados por pesquisadores do FDA em varias espécies de animais: ratos, camundongos, coelhos e gatos, não demonstraram efeitos adversos na reprodução ou no desenvolvimento fetal (Ruddick e col.,

1979).

Em 1975, o FDA designou um comitê para estudar todos os aspectos da controvérsia acerca do uso deste corante. Este comitê concluiu que os dados disponíveis não estavam de acordo com os protocolos e especificações das normas em vigor para os estudos toxicológicos. Em 1976, devido a inexistência de suficiente evidência científica que demonstrasse que o Amarantho é seguro, o FDA cancelou a permissão provisória de uso do composto e, em 1980, foi negada a petição para listagem permanente do Amarantho para uso em alimentos (IFT, 1986).

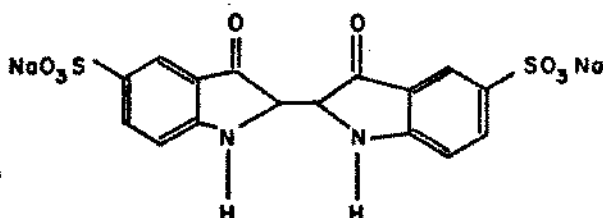
Devido ao resultado controverso entre estes estudos, o JECFA transformou a IDA permanente do Amarantho, estabelecida em sua primeira avaliação em 1964, para temporária no valor de 0 - 0,75 mg/kg p.c. (FAO/WHO, 1975). Em 1978, numa nova avaliação deste composto, foi prorrogado o prazo para a apresentação dos estudos de toxicidade à longo prazo para 1982, quando, então, foram avaliados novos estudos sobre seu metabolismo e mutagenicidade, não revelando nenhuma toxicidade potencial. A IDA temporária foi prorrogada para 1984 (FAO/WHO, 1982).

Em 1984, foram avaliados estudos sobre a carcinogenicidade do Amarantho, utilizando-se ratos Wistar, nos quais a exposição ao composto tinha sido realizada, inclusive durante os períodos de gestação e lactação. Os resultados obtidos não indicaram nenhum efeito carcinogênico devido ao Amarantho. A dose sem efeito tóxico, com respeito a calcificação renal foi de 50 mg/kg p.c./dia, sendo então atribuída uma IDA de 0 - 0,5 mg/kg p.c. (FAO/WHO, 1984). Este corante é utilizado no Canadá, Suécia, Dinamarca, Alemanha, Japão e nos países da Comunidade Económica

Europeia (IFT, 1986).

2.2- Corantes Indigóides

2.2.1- Azul de Indigotina



Em sua primeira avaliação pelo JECFA em 1964, este composto foi classificado na categoria de corantes alimentares para os quais os dados toxicológicos disponíveis não eram suficientes para que se estabelecesse uma IDA para o homem (Berdick, 1982). Posteriormente, numa nova avaliação em 1966, foi estabelecida uma IDA temporária de 0 - 2,5 mg/kg p.c. tendo sido requisitados estudos de toxicidade à longo prazo em mamíferos não roedores (Vettorazzi, 1981).

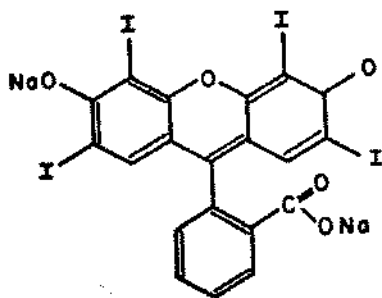
Em 1974, foram submetidos ao Comitê estudos bioquímicos do composto, estudos de toxicidade à longo prazo em ratos e camundongos, estudos sobre mutagenicidade e teratogenicidade, sendo então atribuída uma IDA de 0 - 5 mg/kg p.c. (FAO/WHO, 1975).

O Comitê Científico para Alimentos da Comunidade Económica Europeia endossou a IDA estabelecida pelo JECFA em 1974 e considerou este composto seguro para uso em alimentos (Vettorazzi, 1981).

Este corante é também utilizado no Canadá, na Inglaterra, no Japão e nos Estados Unidos (Berdick, 1982).

2.3- Corantes Xantenos

2.3.1- Vermelho de Eritrosina



O Vermelho de Eritrosina (FD&C Red no. 3) é o único representante da classe dos corantes xantenos de uso permitido em alimentos no Brasil. Consiste basicamente do sal dissodico (ou de potássio) de 2,4,5,7 tetraiodofluoresceína. Está presente em todas as listas de corantes alimentícios permitidos: Comunidade Economica Europeia, Estados Unidos e Reino Unido.

Em suas primeiras avaliações pelos Comitês Internacionais, nos anos sessenta, este corante foi classificado entre aqueles cujos dados toxicológicos disponíveis não eram suficientes para que se estabelecesse uma IDA para o homem.

Estudos realizados por Daniel, 1962, em ratos mostraram que este corante é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal e é amplamente excretado nas fezes (55-72%), sendo que, nenhum traço do composto foi detectado na urina e pequena quantidade foi excretada na bile.

Posteriormente, estudos de toxicidade aguda e à curto e longo prazo realizados em várias espécies de mamíferos, roedores e não roedores, permitiram que se estabelecesse uma IDA de 0 - 2,5 mg/kg p.c. (Vettorazzi, 1981).

Em estudos de toxicidade à longo prazo realizados em ratos por Hansen e col. em 1973, o único distúrbio patológico macroscópico relacionado a ingestão do corante foi a dilatação do cecum, que, no entanto, ao ser examinado ao microscópio apresentou histologia normal.

Existe uma preocupação sobre possíveis correlações entre a ingestão de Eritrosina e distúrbios no funcionamento da glândula tiróide, devido a possibilidade de liberação de iodo do corante e consequente aumento dos níveis de iodo ligado à proteína que se combina com o iodo no soro sanguíneo (Protein Bound Iodine - PBI). Este fenômeno já foi verificado por vários autores (Bowie, e col, 1966; Hansen e col., 1973) e é transitório, ou seja, algum tempo após a ingestão do composto os valores de PBI retornaram ao normal e não foram constatados distúrbios no funcionamento da glândula tiróide (estudos histológicos da glândula e monitoramento dos níveis de tiroxina).

Os Comitês Internacionais ainda não se pronunciaram definitivamente sobre o corante Eritrosina. O JECFA em sua avaliação do composto, em 1986, reduziu a IDA para 0 - 1,25 mg/kg p.c. e requisitou maiores informações sobre a farmacocinética do corante e informações histopatológicas da glândula tiróide dos animais utilizados nos estudos de toxicidade à longo prazo.

Na última avaliação do composto em 1988, foram submetidos ao JECFA novos estudos que confirmaram que a Eritrosina é fracamente absorvida. Estes mesmos estudos não indicaram os mecanismos pelos quais a Eritrosina exerce seus efeitos na glândula tiróide, mas indicam, entretanto, que o iodo inorgânico "per se" não é o agente causador destes efeitos. Nesta última avaliação, os

estudos farmacocinéticos requeridos pelo Comitê em 1986, não foram apresentados, tendo sido decidido prorrogar a IDA temporária, pendente dos resultados destes estudos. Com base no nível sem efeito tóxico da Eritrosina em relação à função tireoidiana, foi-lhe atribuída uma IDA temporária de 0 - 0,05 mg/kg p.c.

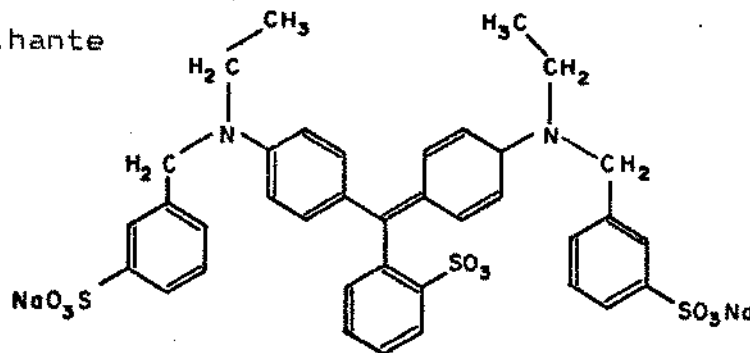
Para 1990 foram requisitados estudos farmacocinéticos que relacionem a quantidade de corante absorvida à quantidade ingerida e que tornem possível que se estabeleça a relação de concentração entre a Eritrosina presente no sangue e nos tecidos, assim como seu efeito e mecanismo de ação sobre a tireóide. Foi preparado um adendo à monografia toxicológica elaborada em 1986, e as especificações do composto foram revisadas (FAO/WHO, 1987).

2.4- Corantes Trifenilmetanos

Este grupo de corantes possui como estrutura química básica três radicais arila, geralmente grupos fenílicos, ligados a um átomo de carbono central. Possuem ainda em comum a presença de grupos sulfônicos que lhes confere alta solubilidade em água. Devido ao seu baixo pka, possuem também baixo grau de absorção pelo trato gastrointestinal (Drake, 1975).

No Brasil, apenas um constituinte desta classe de corantes tem seu uso permitido em alimentos, o corante Azul Brilhante. Em outros países são utilizados também o Verde S e Violeta 6B.

2.4.1- Azul Brilhante



Este composto (sal dissódico) é utilizado em alimentos (refrigerantes, sorvetes, produtos de confeitaria), medicamentos e cosméticos. Inicialmente, em 1959 e 1966, este corante foi classificado pelo JECFA, entre os corantes para os quais os dados toxicológicos disponíveis eram insuficientes para que se estabelecesse uma IDA, pois, apesar dos vários estudos sobre sua toxicidade até mesmo à longo prazo, os dados bioquímicos eram insuficientes (Vettorazzi, 1981).

Posteriormente, em 1969, foi estabelecida uma IDA de 0 - 12,5 mg/kg p.c. (Berdick, 1982).

Estudos de toxicidade crônica realizados nos laboratórios do FDA estabeleceram níveis sem efeito tóxico de 5% e 2% na dieta

para ratos e cachorros, respectivamente. Em 1969, com a revisão deste e de outros estudos, foi estabelecida pelo FDA uma IDA de 5 mg/kg p.c. (Berdick, 1982).

Na Comunidade Econômica Européia, o Comitê Científico para Alimentos permitiu o uso deste corante em 1975, estabelecendo uma IDA temporária de 2,5 mg/kg p.c. Esta IDA, em 1979, foi modificada para 12,5 mg/kg p.c. quando estudos bioquímicos demonstraram que este corante é pouco absorvido e quase que completamente excretado nas fezes (Phillips e col., 1980; Brown e col., 1980).

Este corante é utilizado no Canadá, na Inglaterra e no Japão (Berdick, 1982).

3- A Utilização da Mitocôndria como Instrumento de Avaliação Toxicológica

3.1- Mitocôndria: Importância e Funções

As células são compostas de várias estruturas altamente especializadas responsáveis pelos processos metabólicos essenciais à manutenção da vida celular.

Muitas substâncias tóxicas exercem seus efeitos nocivos à célula através de danos a uma ou mais destas estruturas ou organelas celulares. Este dano pode ocorrer através de uma ação direta do agente tóxico às organelas ou de maneira indireta, interagindo com seus processos metabólicos. Por estas razões, a avaliação das organelas celulares, isoladamente, como unidades básicas da função celular, pode fornecer informações úteis do mecanismo da ação tóxica de substâncias xenobióticas (Fowler e col., 1982).

Dentre as organelas celulares, destaca-se a mitocôndria pelo seu importante papel mediando várias funções metabólicas dentre as quais a oxidação de substratos e consequente produção de energia na forma de ATP é uma das mais importantes.

As mitocôndrias consistem de um sofisticado sistema de membranas onde estão localizadas as enzimas que catalisam a respiração celular. Esta organela possui também todas as enzimas do ciclo de Krebs, as enzimas associadas ao transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa; enzimas para a síntese de fosfolípidos e para a oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias possuem ainda a capacidade de promover síntese de proteínas (Lehninger, 1986).

As enzimas mitocondriais não se distribuem ao acaso pela organela, mas estão localizadas em sub-compartimentos específicos da membrana externa e interna e matriz mitocondrial. A membrana externa é permeável à muitas substâncias, enquanto que a interna por ser mais seletiva é considerada semi-permeável.

A cadeia de transporte de eletrons esta localizada na base da membrana interna e seus componentes podem ser fracionados em quatro complexos. Cada complexo representa a menor unidade onde um setor da cadeia de transporte de eletrons pode ser isolado sem perder suas características: a habilidade de reagir com aceptores naturais de eletrons, a susceptibilidade a inibidores seletivos e a manutenção de seus valores de oxidorredução (Moreland, 1984).

O complexo I consiste de uma desidrogenase NADH-dependente e de seus centros de ferro e enxofre. O componente flavinico, FMN, não esta ligado covalentemente à desidrogenase. Este primeiro complexo é reduzido por NADH e oxidado pela Coenzima-Q.

O complexo II é formado pela succinato desidrogenase e seu centro de ferro e enxofre. É reduzido por succinato e oxidado pela Coenzima-Q. O componente flavinico, FAD, está ligado covalentemente através de um residuo de histidina a cadeia peptídica da desidrogenase.

O complexo III consiste dos citocromos b e c₁ e de seu centro de ferro e enxofre específico. É reduzido pela Coenzima-Q e oxidado pelo citocromo c.

O complexo IV contem os citocromos a e a₃; é reduzido pelo citocromo c e oxidado pelo oxigênio molecular, o acceptor final de eletrons. A ubiquinona é o elo de ligação entre os complexos I, II e III, e o citocromo c conecta os complexos III e IV.

O número de moléculas de ATP sintetizadas durante a oxidação dos substratos pelo oxigênio molecular, via cadeia respiratória (cadeia de transporte de elétrons) varia de acordo com duas classes de substratos: a primeira é composta por aqueles que usam NAD como aceptor de elétrons e são capazes de gerar três moles de ATP - malato, piruvato, α -cetoglutarato, β -hidroxibutirato. O succinato pertence a outra classe de substrato e gera dois moles de ATP por molécula oxidada (Moreland, 1984; Lehninger, 1986).

3.2- Síntese de ATP

Apesar do grande volume de trabalhos científicos realizados procurando elucidar os caminhos e mecanismos pelos quais o ATP é gerado, muitos aspectos permanecem obscuros.

As hipóteses apresentadas para o mecanismo da fosforilação oxidativa (esterificação de difosfato de adenosina, ADP, com fosfato inorgânico para produção de ATP) diferem, principalmente, no que se assume ser a natureza do composto intermediário cuja energia é derivada de reações de oxido-redução e utilizada posteriormente para sintetizar ATP.

A hipótese mais largamente aceita é a quimiosmótica que se baseia na permeabilidade seletiva da membrana interna da mitocôndria à cations e na transferência de prótons através desta mesma membrana de modo vetorial. De acordo com esta hipótese, a primeira reação com conservação de energia acoplada ao transporte de elétrons envolve a translocação de prótons de dentro para fora da membrana interna. Devido à relativa impermeabilidade desta membrana à prótons e outros íons, ocorreria a formação de um gradiente eletroquímico. A energia

osmótica gerada por este gradiente é utilizada para a síntese de ATP (Mitchell, 1961; 1966).

3.3- A Utilização da Mitocôndria em Ensaio Toxicológicos

Gallo e col., 1976 estudaram o efeito do 2,6-dicloro-4-nitroanilina (DCNA) e seus principais metabólitos: 3,5-dicloro-4-aminofenol (DCAP) e 2,6-dicloro-p-fenildiamina (DCPD) na função respiratória de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. O DCNA é utilizado tanto como herbicida como fungicida e possui estrutura semelhante ao 2,4-dinitrofenol, composto conhecido como um clássico exemplo de desacoplador da fosforilação oxidativa.

Os efeitos do DCNA e seus metabólitos foram estudados tanto "in vitro", com a adição dos compostos à preparações mitocondriais isoladas de ratos controle, como "in vivo", utilizando as organelas de ratos submetidos anteriormente à administração do composto. Os primeiros experimentos, "in vitro", revelaram que tanto o DCNA como o DCAP, desacoplam a fosforilação oxidativa e inibem o transporte de elétrons em presença de succinato e α -hidroxibutirato. Numa segunda etapa, os compostos foram administrados à ratos em diferentes concentrações e, a seguir, estes animais tiveram sua função respiratória mitocondrial hepática testada. Não havendo alteração em relação aos controles, como verificado "in vitro" (Gallo e col., 1976).

Manning e Moreland, 1981, verificaram que Clordecone, um composto clorado policíclico utilizado como inseticida, atua como desacoplador em mitocôndrias de fígado de rato. Este composto estimula a velocidade respiratória no estado IV e provoca a perda da integridade da membrana interna mitocondrial.

Os autores sugerem que, os efeitos adversos provocados na membrana mitocondrial como: perda de integridade, desacoplamento, perda de proteína solúvel, que levam a uma interferência com a produção de ATP, podem estar relacionados com muitas das alterações metabólicas e mudanças ultraestruturais observadas em vários órgãos (fígado, adrenais e gônadas) após exposição ao Clordecone.

Compostos contendo arsênico orgânico também foram bastante estudados quanto à seus efeitos em preparações mitocondriais. Resultados semelhantes aos encontrados por Kronenberg e Brabec, 1982, sobre os efeitos do 10,10'-oxibisphenoxarsine em mitocôndrias hepáticas "in vitro", foram relatados por vários autores (Kronenberg & Brabec, 1982). Os experimentos realizados revelaram que este e outros compostos organo-arseniacaais são potentes inibidores da respiração mitocondrial. Objetivando determinar a causa desta inibição, foram realizados estudos que revelaram que o composto em questão inibe várias desidrogenases do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

Apesar da grande maioria dos estudos realizados procurando verificar possíveis efeitos adversos de vários tipos de compostos (inseticidas, corantes, compostos policíclicos e micotoxinas), utilizarem preparações isoladas de fígado de rato, existem também vários trabalhos realizados com mitocôndrias de coração, de rim e a utilização de animais não convencionais como, por exemplo, peixes (Sinhaseni e col., 1983).

Deve-se ressaltar que esta escolha está relacionada ao conhecimento do órgão alvo do composto em estudo, sendo que, o

figado e os rins são escolhas naturais devido ao seu papel importante no metabolismo e excreção de xenobióticos.

III- MATERIAIS E METODOS

1) Corantes Utilizados para Avaliação da Função Respiratória Mitochondrial "in vitro".

Foram utilizados os seguintes corantes, fornecidos pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

- Vermelho de Eritrosina	Grau de pureza: 86,60%
- Vermelho Sólido E	Grau de pureza: 91,31%
- Amarelo de Tartrazina	Grau de pureza: 85,30%
- Vermelho 40	Grau de pureza: 89,90%
- Ponceau 4 R	Grau de pureza: 84,84%
- Amarelo Crepúsculo	Grau de pureza: 87,23%
- Amaranto	Grau de pureza: 89,90%
- Azul de Indigotina	Grau de pureza: 88,58%
- Azul Brilhante	Grau de pureza: 90,22%
- Escarlata GN	Grau de pureza: 89,45%
- Laranja GGN	Grau de pureza: 87,34%

Foram também utilizados, para fins de comparação, o corante Eritrosina da marca Sigma, com grau de pureza de 98%, e aquele fornecido pela ICI do Brasil S. A., com grau de pureza de 85,95% (ver item III-2).

2) Corante Utilizado para Avaliação da Função Respiratória Mitochondrial "in vivo".

Para este estudo foi utilizado o corante Eritrosina fornecido pela ICI do Brasil S.A., com as seguintes especificações técnicas:

- Grau de Pureza: 85,95%
- Substâncias insolúveis em água: 0,113%
- Substâncias voláteis à 135°C: 4,9%
- Chumbo: $2,05 \pm 0,23$ mg/kg
- Cobre: $\leq 0,13$ mg/kg
- Estanho: < 50 mg/kg
- Zinco: < 5 mg/kg
- Corantes subsidiários: 2,4,5 triiodo fluoresceína e 2,5 diiodo fluoresceína em quantidades menores que 4%.

3) Obtenção das Suspensões Mitocondriais:

3.1- Mitocôndria de Fígado de Rato:

Neste experimento foram utilizados ratos Wistar adultos machos e fêmeas, pesando entre 180 e 250 g, os quais foram mantidos em jejum noturno por 12 horas antes da morte por concussão cerebral.

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas segundo Schneider e Hogeboom, 1950, conforme procedimento descrito a seguir.

Após a morte do animal, seu fígado foi retirado rapidamente e mergulhado em solução de sacarose 250 mM tamponada com Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-etano-sulfônico) 2,0 mM, pH 7,2, na presença de EGTA (ácido etileno glicol bis (-aminoetil eter) N, N'-tetracético) 0,5 mM mantida em banho de gelo. A seguir, o fígado foi picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi então centrifugado por 5 minutos a 2500xg. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento foi novamente centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e centrifugados por 10 minutos a 11500 xg. A fase lipídica superior foi retirada com o auxílio de pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado e novamente centrifugado nas condições anteriores. Terminada a centrifugação, as mitocôndrias foram ressuspensas em solução de sacarose 0,25 M. Todo o procedimento foi realizado a 0°C em centrifuga refrigerada (Vercesi e col., 1978).

3.2- Mitocôndria de Rim de Rato:

Para o isolamento de mitocôndrias de rim de rato, após a retirada do órgão do animal, foi removida a cápsula fibrosa que o envolve, e, a seguir, procedeu-se como descrito anteriormente para mitocôndrias hepáticas (item 3.1), alterando-se apenas as velocidades de centrifugação. O homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a 2000 xg e o sobrenadante resultante foi novamente centrifugado por 10 minutos a 10000 xg.

3.3- Dosagem de Proteína:

A concentração de proteína da suspensão mitocondrial obtida foi determinada segundo o método espectrofotométrico de Kies e Murphy, 1960. Este método baseia-se na medida da diferença de absorbância da solução de proteína em NaOH 5 mM, nos comprimentos de onda de 215 e 225 nm. Esta diferença é diretamente proporcional à concentração de proteína na solução. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

4) Efeito dos Corantes Orgânicos Sintéticos Artificiais na Função Mitocondrial Hepática e Renal "in vitro"

4.1- Consumo de Oxigênio:

A avaliação da função mitocondrial hepática e renal foi realizada através da medida do consumo de oxigênio dissolvido no meio de reação.

Os experimentos foram realizados em câmara de vidro

termoestabilizada ($32 \pm 0,5^\circ\text{C}$), dotada de agitação magnética com capacidade de 1,0 - 2,0 ml. Uma representação esquemática da câmara de vidro utilizada está apresentada na Figura 2.

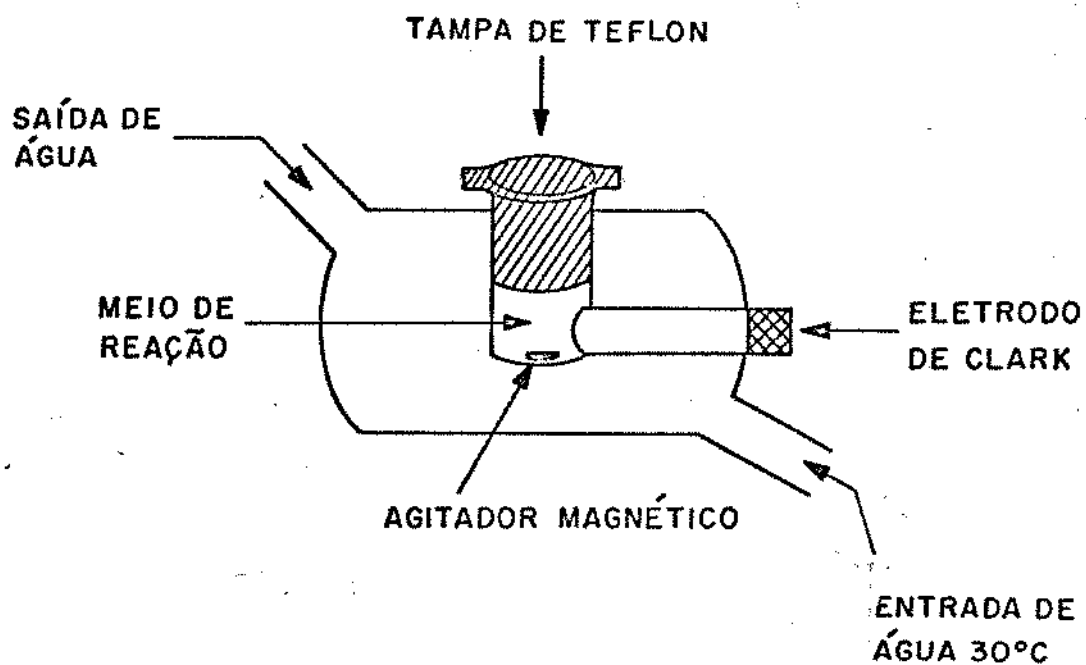


FIGURA 2 - Representação esquemática da câmara de vidro utilizada nos ensaios com mitocôndrias isoladas

O meio de incubação básico foi constituído por KCl 130 mM, tampão HEPES 2,0 mM, EGTA 0,5 mM, fosfato 1,0 mM e 1 mg/ml de proteína mitocondrial. Como substratos respiratórios foram utilizados α -cetoglutarato 5 mM para o sítio I e succinato 2 mM para o sítio II, tendo o pH destas soluções sido corrigido para 7,2.

O consumo de oxigénio, também chamado de velocidade respiratória, foi medido polarograficamente utilizando-se eletrodo específico tipo Clark LN 4316 (Yellow Springs Instruments Co.) conectado a um oxígrafo Gilson.

4.2- Controle Respiratório:

Inicialmente, foi medido o estímulo da respiração provocado pela adição de 200 nmoles de ADP (estado III) e a velocidade respiratória quando o consumo de oxigénio retorna ao estado original (estado IV). O quociente obtido entre as velocidades respiratórias no estado IV e estado III é chamado de controle respiratório.

A seguir, foi adicionada uma solução de cada corante testado, Eritrosina, Vermelho Sólido E, Ponceau 4R, Vermelho 40, Amarelo Crepúsculo, Amarelo de Tartrazina, Azul de Indigotina, Amaranço, Laranja GGN, Escarlate GN e Azul Brilhante, ao meio de reação descrito anteriormente em 4.1 de modo que a concentração final do corante fosse 0,1 mg/ml. Foram, então, realizadas novas medidas das velocidades de consumo de oxigénio nos estados III e IV, comparando estes valores com aqueles obtidos para mitocôndrias controle.

4.3- Efeito da Concentração do Corante na Velocidade Máxima de Respiração:

Uma vez observada a inibição da respiração mitocondrial pelos corantes testados foi verificado o efeito destes compostos na velocidade máxima de respiração (estado III, desacoplado).

Para tanto, foram realizados novos experimentos adicionando-se ao meio de reação um desacoplador da respiração, p-trifluorometoxicarbonil ciano fenil hidrazina (FCCP). Isto tornou possível verificar o efeito de diferentes concentrações de cada corante na velocidade máxima de respiração, permitindo a obtenção de uma curva dose-resposta para cada corante. Para a construção desta curva dose-resposta foram utilizadas concentrações decrescentes do corante diluindo-se a solução original (0,1 mg/ml) até obter-se resposta igual àquela apresentada pela mitocôndria controle.

5) Avaliação do Efeito da Ingestão de Eritrosina na Função Mitocondrial "in vivo":

Foi realizado um estudo sub-cronico (90 dias) do efeito da ingestão do corante Eritrosina utilizando-se ratos Wistar.

Ao final do experimento, foi avaliada a função mitocondrial de todos os animais sobreviventes, conforme procedimento descrito anteriormente no item 4.

5.1- Condições do Ensaio Biológico:

Os ratos Wistar, machos e fêmeas, utilizados neste estudo, foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas, S.P. e tinham idade de 30 dias com peso inicial médio de 44 g.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço

galvanizado. A temperatura da sala permaneceu em torno de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com luz fluorescente das 7:00 às 17:00 horas.

Todos os animais receberam ração comercial "ad libitum" (Anderson-Clayton).

Antes do início do período experimental, todos os animais passaram por um período de adaptação de quinze dias. O período experimental compreendeu o período imediatamente após o término da fase de adaptação até o momento do sacrifício dos animais: 13/06/86 a 15/09/86.

Ao completar-se o período de adaptação, os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo Controle: constituído por animais, fêmeas (10) e machos (7), denominados grupos C1 e C2 respectivamente, aos quais foram administrados antes e durante o período experimental, água e ração "ad libitum".
- Grupos A e B constituídos, respectivamente, por animais fêmeas (9) e machos (9), aos quais foram administrados uma solução do corante Eritrosina, em concentração correspondente a 1000 mg de corante/kg de peso corpóreo médio dos animais de cada grupo, durante todo o período experimental.
- Grupos C e D constituídos, respectivamente, por animais fêmeas (8) e machos (7), aos quais foram administrados corante Eritrosina em concentração correspondente a 500 mg de corante/kg de peso corpóreo médio dos animais de cada grupo, durante todo o período experimental.
- Grupos E e F constituídos, respectivamente, por animais fêmeas (7) e machos (6), aos quais foram administrados corante Eritrosina em concentração correspondente a 100 mg de corante/kg

de peso corpóreo médio dos animais de cada grupo, durante todo o período experimental.

O corante Eritrosina foi fornecido aos animais dissolvido na água, que foi administrada aos mesmos "ad libitum".

5.2- Ganho de Peso:

Para o acompanhamento do ganho de peso dos animais, foram realizadas pesagens dos mesmos de três em três dias, durante o período experimental.

5.3- Consumo de Corante:

A cada semana foram preparadas novas soluções de corante, de modo que, de acordo com o ganho de peso dos animais, fosse administrada a quantidade de corante desejada para cada grupo.

O consumo de corante foi obtido pela diferença entre o volume inicial administrado, 300 ml, e o volume residual após três dias, medido com o auxílio de uma proveta.

5.4- Consumo de Ração:

O alojamento dos animais em gaiolas individuais permitiu também que se acompanhasse o consumo individual de ração durante o período de experimentação.

De acordo com o mesmo procedimento utilizado nos itens anteriores, pesava-se o recipiente que continha a ração a cada 3 dias, sendo que, o consumo foi obtido pela diferença entre o peso inicial e o peso residual após tres dias.

A pesagem dos animais e a medida do consumo de ração, água e corante eram realizadas sempre no período da manhã, às 9:00 horas.

5.5- Avaliação da Função Respiratória Mitocondrial:

Após o período experimental, os animais foram sacrificados por concussão cerebral e imediatamente, após abertura do abdome, foi realizada a excisão de um fragmento do lobo hepático (aproximadamente 0,5 g) o qual foi colocado em solução de sacarose 250 mM, tamponada com EGTA 0,5 mM mantida em banho de gelo. Este fragmento hepático foi utilizado para a obtenção das suspensões mitocondriais que, a seguir, foram testadas quanto à sua função respiratória, conforme procedimento descrito nos itens 3 e 4.

6) Avaliação Histológica do Efeito da Ingestão de Eritrosina:

Os animais utilizados no item 5 foram dissecados e fragmentos do pulmão, fígado, estômago, baço, intestino delgado e grosso, pâncreas, gânglios mesentericos, rins, adrenais e bexiga foram colhidos e fixados em solução fixadora de Bouin-Acético (Formaldeído comercial 40% - 25 ml; solução aquosa saturada de ácido picrico - 70 ml; ácido acético comercial 25% - adicionada no momento de uso - 5 ml).

O fígado, baço, bexiga e rins foram pesados antes da retirada das amostras para a fixação.

Todos os órgãos foram examinados sob lupa para avaliação macroscópica dos mesmos.

As amostras permaneceram na solução fixadora por 24 horas; após este período foram lavadas em água e recolocadas em solução fixadora de formol a 4%.

Após 30 dias, as amostras foram sucessivamente lavadas para diminuir-se a impregnação dos tecidos pelo ácido picrico e, após desidratação, foram incluídas em parafina, seccionadas (corte 8 um), coradas em Hematoxilina e Eosina e montadas em lâminas histológicas segundo técnicas de rotina.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico (Olympus CBA) aumento de 1000 vezes e fotomicrografadas, com filme preto e branco, 32 ASA.

7) Tratamento Estatístico

Para a análise estatística dos dados obtidos na avaliação do efeito da ingestão do corante Eritrosina na respiração mitocondrial, utilizou-se análise de variância. Este mesmo procedimento foi seguido com os dados obtidos para ganho de peso, consumo de ração e peso relativo dos órgãos dos animais utilizados neste estudo (Armitage, 1974).

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Efeito, "in vitro", de Corantes Orgânicos Sintéticos Artificiais na Respiração Mitocondrial

Existem vários parâmetros bioquímicos que podem ser utilizados para avaliar o efeito de compostos xenobióticos na função mitocondrial dentre os quais se destaca a função respiratória.

A avaliação da função respiratória é realizada através do monitoramento do consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas. Um método bastante utilizado foi o respirômetro de Warburg, mais recentemente substituído pelo eletrodo específico de oxigênio, o eletrodo de Clark, acoplado a um registrador. A eficiência desta técnica como instrumento em ensaios toxicológicos depende em grande parte do procedimento utilizado para isolar a mitocôndria antes de sua avaliação pois é importante considerar a relação entre as perturbações das funções metabólicas da organela e sua integridade física.

Um índice que revela se a membrana está íntegra e que, portanto, a obtenção das preparações mitocondriais foi eficiente é o controle respiratório, o qual é definido por Chance & Willians, 1965, como o quociente obtido entre as velocidades respiratórias no estado IV e estado III.

O estado IV, ou estado de repouso, é caracterizado pela baixa velocidade de consumo de oxigênio pela mitocôndria, na ausência de receptor de fosfato (ADP), mesmo na presença de substratos respiratórios (ex: α -cetoglutarato e succinato). O estado III se caracteriza pela rápida velocidade de respiração e de

fosforilação , após a adição de ADP. Quando o ADP adicionado for consumido, reestabelece-se o estado IV. Existem substâncias conhecidas como agentes desacopladores que impedem o reestabelecimento do estado IV. Nesta condição, chamada de estado III, desacoplado, obtém-se a velocidade máxima de respiração, condição que facilita o estudo do efeito de substâncias xenobióticas à mitocôndria (Chance & Williams, 1965; Lehninger, 1986).

No presente estudo, o coeficiente respiratório (CR) das preparações mitocondriais obtidas, apresentaram valores acima de 5, índice considerado satisfatório (Lehninger, 1986).

Todos os corantes orgânicos sintéticos artificiais utilizados neste estudo: Eritrosina, Vermelho Sólido E, Ponceau 4R, Vermelho 40, Amarelo Crepúsculo, Amarelo de Tartrazina, Azul de Indigotina, Amaranço, Laranja GGN, Escarlata GN e Azul Brilhante, quando adicionados à preparações mitocondriais isoladas de fígado e de rim de ratos Wistar provocaram alteração no consumo de oxigênio em comparação com os valores obtidos sem a adição dos mesmos. Isto foi evidenciado pela redução do controle respiratório (velocidade do estado IV / velocidade do estado III) conforme mostram os dados da Tabela 1.

Uma vez verificada esta alteração no controle respiratório, foram realizados novos experimentos para elucidar se a origem desta alteração era devida a um efeito na velocidade do estado III, na velocidade do estado IV ou em ambas.

Os novos experimentos realizados mostraram que a velocidade do estado III, quando desacoplado, era inibida conforme apresentado na Tabela 2 . Esta inibição foi semelhante àquela

verificada no controle respiratório (Tabela 1). Portanto, para verificar um possível efeito na velocidade do estado IV foram utilizados unicamente aqueles corantes que tinham apresentado maior porcentagem de inibição do coeficiente respiratório: Eritrosina, Vermelho Sólido E, Azul Brilhante e Escarlata GN (Tabela 1). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Muitos compostos de diversas classes e de diferentes estruturas químicas afetam a fosforilação oxidativa. Estes compostos podem interagir em diferentes reações mediadas pela mitocôndria, sendo classificados em:

a) Inibidores do Transporte de Eletrons

São substâncias que se caracterizam pela sua habilidade de interromper o fluxo de eletrons em determinado ponto da cadeia respiratória atuando em um de seus quatro complexos. Uma vez que o fluxo de eletrons está interrompido, as reações de fosforilação a ele acopladas também serão inibidas. Dentre os inibidores mais importantes pode-se destacar: rotenona, antimicina-A e cianeto.

b) Agentes Desacopladores

São aquelas substâncias que em concentrações apropriadas impedem a fosforilação do ADP a ATP sem interferir com o transporte de eletrons. De maneira geral, todo composto que promove a dissipação do gradiente de prótons estabelecido pelo transporte de eletrons para outro fim que não seja a síntese de ATP é um agente desacoplador. Pentaclorofenol e 2,4-dinitrofenol são exemplos clássicos de desacopladores que foram utilizados por muitos anos como pesticidas.

TABELA 1 -Porcentagem de diminuição do controle respiratório (CR) de mitocôndrias hepáticas por corantes orgânicos sintéticos artificiais na concentração de 0,1 mg corante/ ml de meio de reação

CORANTE	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO
ERITROSINA	100
VERMELHO SOLIDO E	100
AZUL BRILHANTE	66
ESCARLATE GN	41
VERMELHO 40	38
AMARELO CREPUSCULO	28
AZUL DE INDIGOTINA	25
AMARANTO	20
LAÇANJA GGN	20
PONCEAU 4R	17
AMARELO DE TARTRAZINA	16

Resultados obtidos na presença de succinato como substrato respiratório

TABELA 2 - Porcentagem de inibição da velocidade respiratória do estado III, desacoplado, de mitocôndrias isoladas de fígado e de rim de ratos Wistar por corantes orgânicos sintéticos artificiais na concentração de 0,1 mg corante/ml de meio de reação.

CORANTE	FIGADO	RIM
ERITROSINA	100	100
AZUL BRILHANTE	78	78
VERMELHO SOLIDO E	84	76
VERMELHO 40	68	55
LARANJA GGN	53	35
PONCEAU 4R	45	27
AMARELO CREPUSCULO	44	27
AMARANTO	35	22
AZUL DE INDIGOTINA	30	12
AMARELO DE TARTRAZINA	16	20
ESCARLATE GN	33	46

Resultados obtidos na presença de succinato como substrato respiratório

TABELA 3- Porcentagem de inibição da velocidade respiratória do estado IV de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar por corantes orgânicos sintéticos artificiais, na concentração de 0,1 mg corante/ml de meio de reação.

CORANTE	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO
ERITROSINA	25
AZUL BRILHANTE	22
VERMELHO SOLIDO E	2
ESCARLATE GN	0

Resultados obtidos na presença de succinato como substrato respiratório.

c) Inibidores da Fosforilação Oxidativa

Pertencem a este grupo aquelas substâncias capazes de inibir a fosforilação oxidativa sem impedir contudo, o transporte de elétrons pela cadeia respiratória. Mais especificamente são inibidores da enzima ATP-sintetase. A oligomicina é o exemplo clássico deste tipo de inibidor (Lehninger, 1986).

Os resultados obtidos no presente estudo, permitem afirmar que, os corantes orgânicos sintéticos artificiais estudados, inibem a velocidade máxima de respiração, condição obtida com a utilização de FCCP como desacoplador. Cabe destacar Eritrosina, Vermelho Sólido E e Azul Brilhante, os quais apresentaram porcentagem de inibição acima de 70% (Tabela 2).

Foi então verificado o efeito de diferentes concentrações dos corantes Eritrosina, Vermelho Sólido E, Azul Brilhante e Escarlata GN na inibição da velocidade máxima de respiração (estado III desacoplado), com o propósito de verificar se este efeito mantinha uma relação dose-resposta. Os dados obtidos para mitocôndria hepática, tanto em presença de substrato respiratório de sítio I, α -cetoglutarato, como de sítio II, succinato, estão apresentados nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Na Figura 5, estão apresentados os resultados obtidos para mitocôndria renal na presença de succinato. A partir das Figuras 3, 4 e 5 foi calculada a dose necessária para inibição de 50 % da velocidade máxima de respiração, denominada DI 50 (Tabelas 4 e 5).

Pode-se observar que, na presença de succinato, as porcentagens de inibição verificadas nas mitocôndrias hepática e renal são semelhantes. Estes resultados assemelham-se àqueles

obtidos por Noda e col., 1985, que estudaram a inibição da respiração mitocondrial em suspensões mitocondriais obtidas de fígado de rato, utilizando como substrato respiratório succinato. Os referidos autores verificaram que o grau de inibição da respiração mitocondrial dava-se na seguinte ordem decrescente: corantes xantenos (Eritrosina, Eosina, Rosa Bengal), seguidos pelos corantes trifenilmetanos (Azul Brilhante, Light Green SF e Fast Green FCF) e corantes azo. Esta mesma ordem foi verificada no presente estudo.

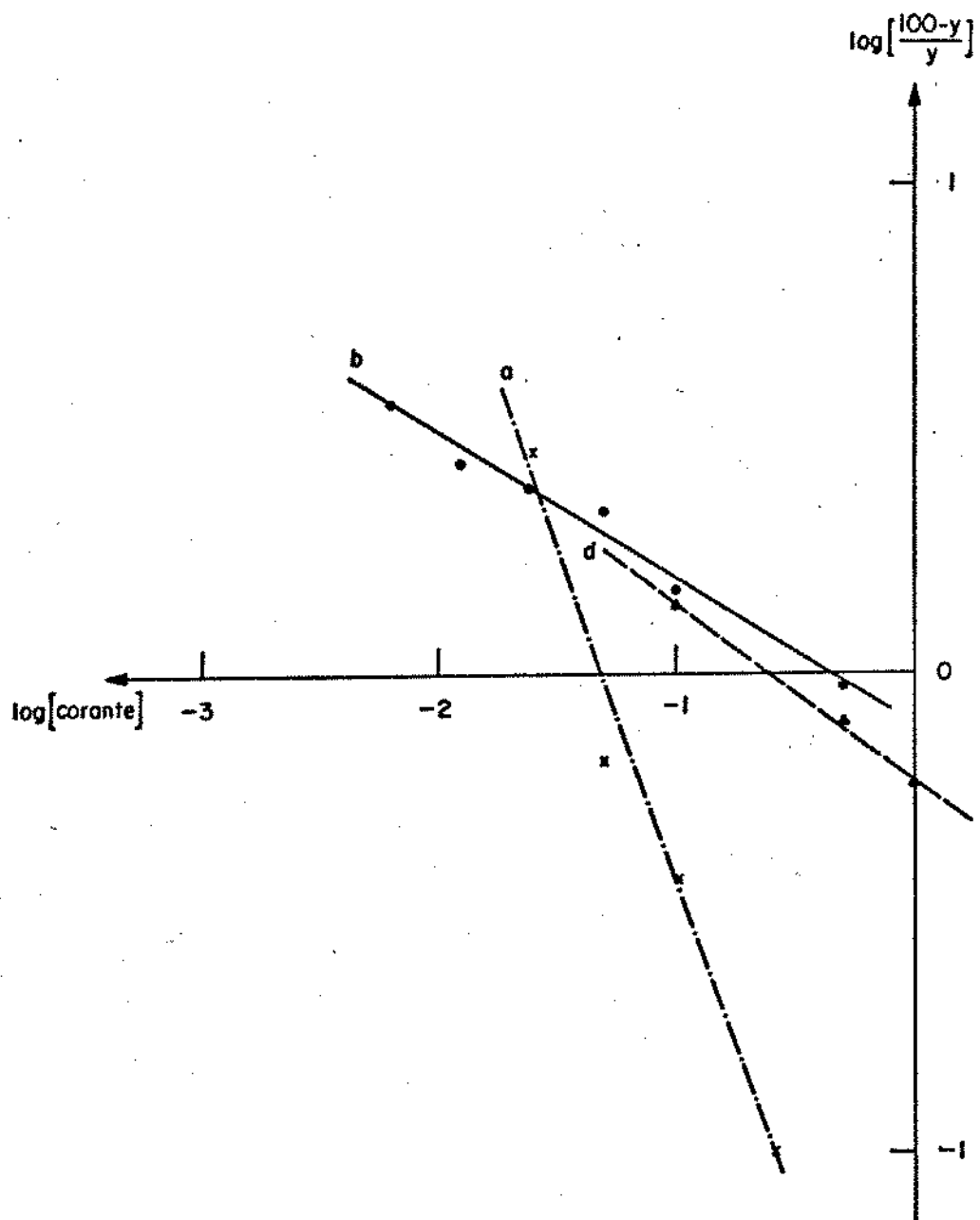


FIGURA 3 - Relação dose-resposta de corantes orgânicos sintéticos artificiais na inibição da velocidade máxima de respiração (estado III, desacoplado) de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar na presença de α -cetogluturato Eritrosina (a); Vermelho Sólido E (b); Azul Brillante (d).

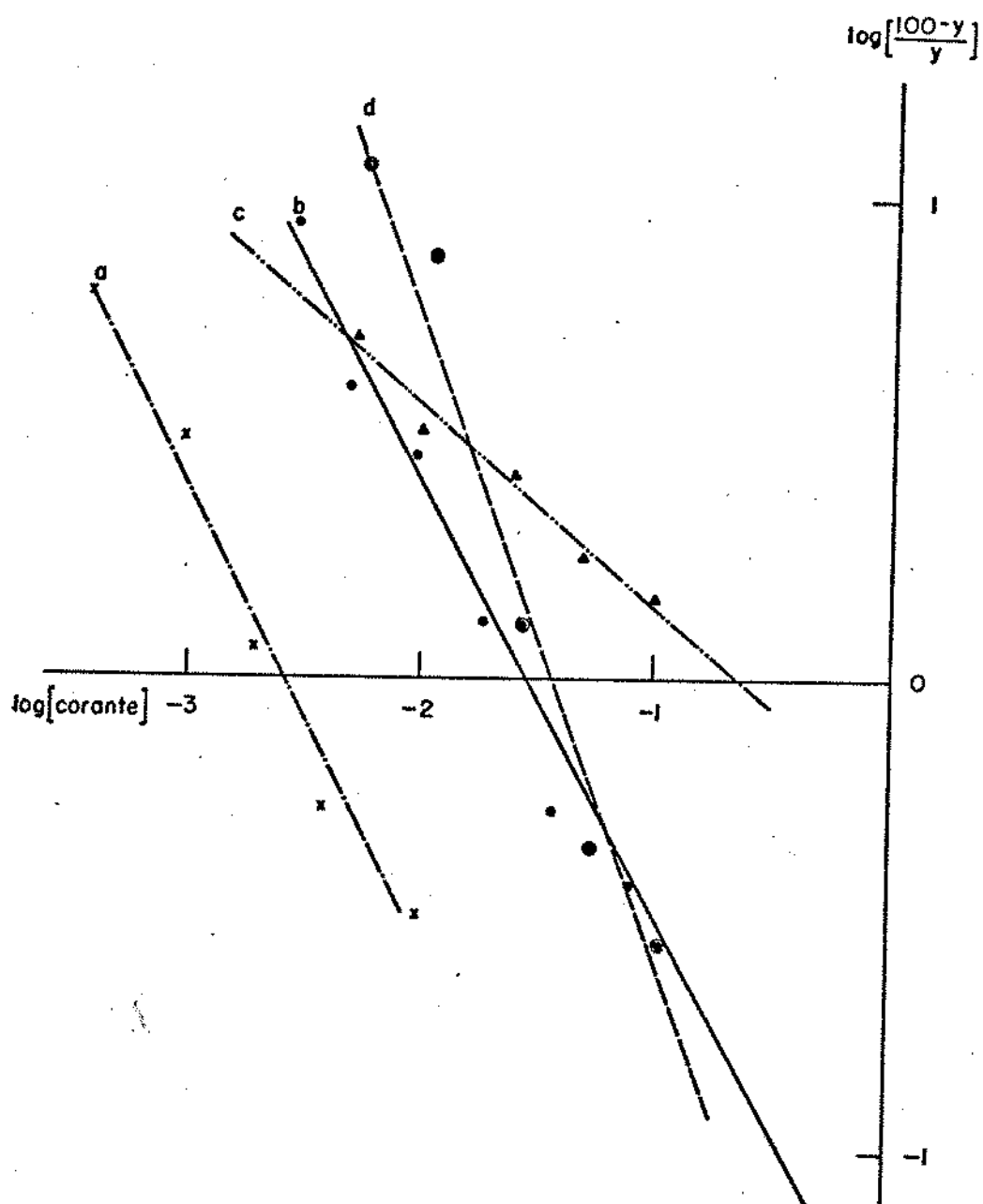


FIGURA 4 - Relação dose-resposta de corantes orgânicos sintéticos artificiais na inibição da velocidade máxima de respiração (estado III, desacoplado) de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar na presença de succinato. Eritrosina (a); Vermelho Sólido E (b); Escarlata GN (c); Azul Brilhante (d).

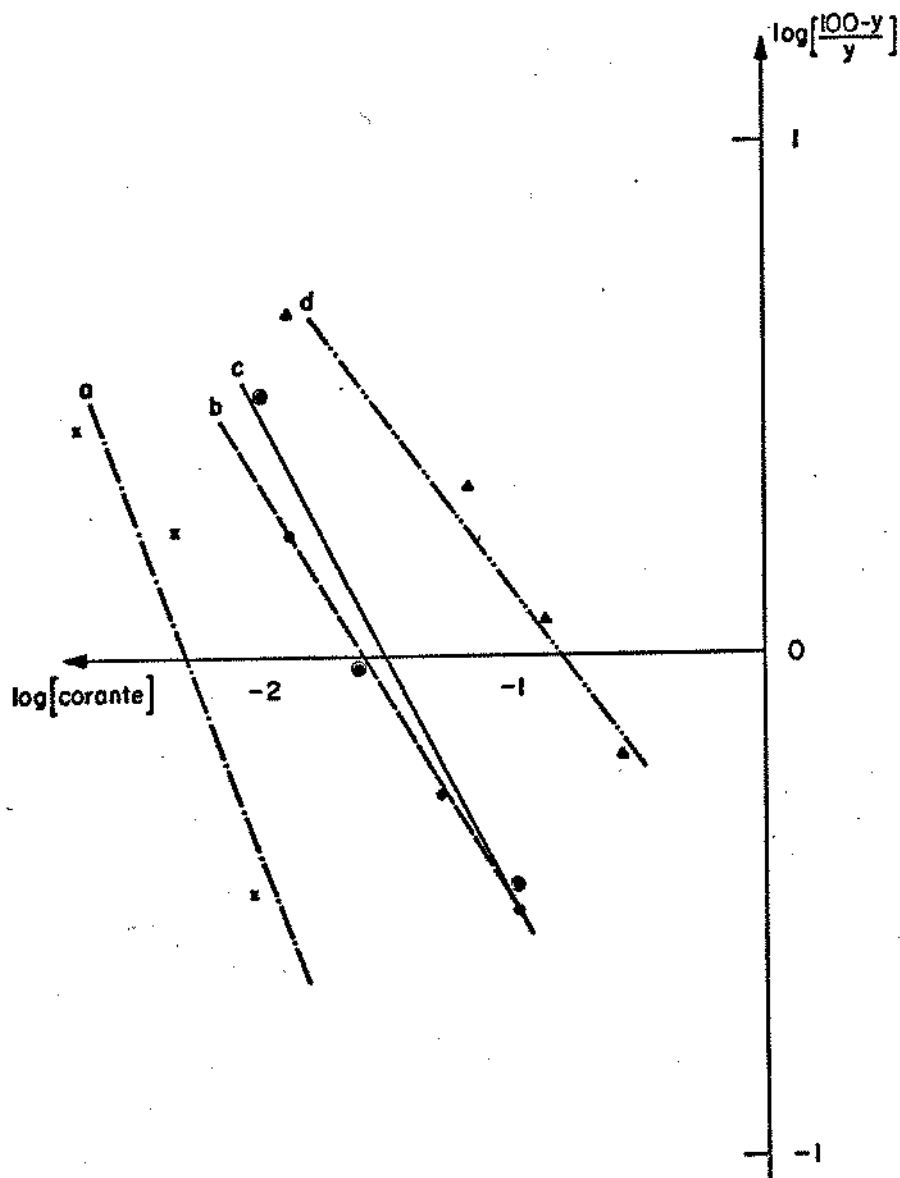


FIGURA 5 - Relação dose-resposta de corantes orgânicos sintéticos artificiais na inibição da velocidade máxima de respiração (estado III, desacoplado) de mitocôndrias isoladas de rim de ratos Wistar na presença de succinato. Eritrosina (a); Vermelho Sólido E (b); Azul Brillante (c); Escarlata GN (d).

TABELA 4 - Dose de inibição 50 (DI 50) de corantes orgânicos sintéticos artificiais em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar, na presença de α -cetogluturato e de succinato.

CORANTE	DI 50	
	α -CETOGLUTARATO	SUCCINATO
ERITROSINA	46	6,6
AZUL BRILHANTE	250	34
VERMELHO SOLIDO E	430	27
ESCARLATE GN	6460	220

DI 50 - Quantidade de corante necessária para inibir em 50% a velocidade máxima de respiração (estado III desacoplado), expressa em miligrama de corante por grama de proteína mitocondrial.

TABELA 5 - Dose de inibição 50 (DI 50) de corantes orgânicos sintéticos artificiais em mitocôndrias isoladas de rim de ratos Wistar, na presença de succinato.

CORANTE	DI 50
ERITROSINA	2,7
VERMELHO SOLIDO E	24
AZUL BRILHANTE	28
ESCARLATE GN	150

DI 50 - Quantidade de corante necessária para inibir em 50% a velocidade máxima de respiração (estado III desacoplado), expressa em miligrama de corante por grama de proteína mitocondrial.

2- Efeito da ingestão do corante Eritrosina em ratos Wistar

Uma vez verificada a inibição da velocidade de consumo de oxigênio, em preparações isoladas de fígado e de rim de ratos Wistar, por corantes orgânicos sintéticos artificiais, apresentou-se a necessidade de avaliar a ocorrência deste mesmo efeito "in vivo", utilizando-se animais submetidos a ingestão desses mesmos corantes.

Para tanto, foi escolhido o corante Eritrosina por ser aquele que havia apresentado maior efeito "in vitro". Foram utilizados oito grupos de animais, machos e fêmeas, submetidos a diferentes ingestas do corante procurando, também, verificar um possível efeito dose-resposta. As doses teóricas escolhidas foram de 1000, 500, 100 e 0 mg de corante/kg de peso corpóreo médio dos ratos de cada grupo. Estas ingestas representam, respectivamente, 1/2, 1/4 e 1/20 da Dose Letal 50 (DL 50) da Eritrosina para ratos, quando administrada por via oral (Hansen e col., 1973). A ingestão de Eritrosina para cada grupo de ratos foi determinada ao longo do experimento, tornando possível estabelecer a ingestão real do corante: 107, 556 e 1193 mg de corante/kg de peso corpóreo para os grupos de ratos fêmeas e 91, 527 e 1086 mg de corante/kg de peso corpóreo para os grupos de ratos machos.

Durante o ensaio de 90 dias, foi feito o acompanhamento do ganho de peso dos animais, assim como do consumo de ração e de corante. Ao final do estudo foi feita a avaliação da função respiratória mitocondrial hepática e um exame histológico dos seguintes órgãos dos animais: pulmão, estômago, baço, fígado,

rins, bexiga, intestinos delgado e grosso e adrenais. Paralelamente à retirada de fragmentos dos órgãos mencionados para o exame histológico, foram realizadas pesagens do fígado, rins, baço e bexiga.

2.1- Ganho de Peso:

Nas Figuras 6 e 7, encontram-se as curvas de ganho de peso para os ratos fêmeas e machos, respectivamente, submetidos a diferentes níveis de ingestão de Eritrosina nas doses reais de 107, 556, 1193 mg de corante/ kg p.c. médio para ratos fêmeas e 91, 527, 1086 mg de corante/kg p.c. medio para ratos machos, assim como seus respectivos grupos controle.

Através da análise estatística dos dados, pode-se observar que não houve diferença significativa, à nível de 5%, no ganho de peso dos animais submetidos à ingestão do corante Eritrosina quando comparados com os animais dos grupos controle (Tabela 6).

Resultados semelhantes foram relatados por Butterworth e col., 1976, em estudo de toxicidade subcrônica, 90 dias, utilizando ratos SPF (linhagem ICI Alderley Park e Carworth Farm E). Neste experimento, a administração do corante foi feita por via oral adicionado à dieta dos animais nos níveis aproximados de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%, correspondendo à uma ingestão média de corante de 160, 330, 690 e 1750 mg/kg de peso corpóreo médio/dia, para ratos machos e 170, 370, 730 e 1470 mg/kg de peso corpóreo médio/dia, para ratos fêmeas, níveis estes semelhantes aos utilizados em nosso trabalho.

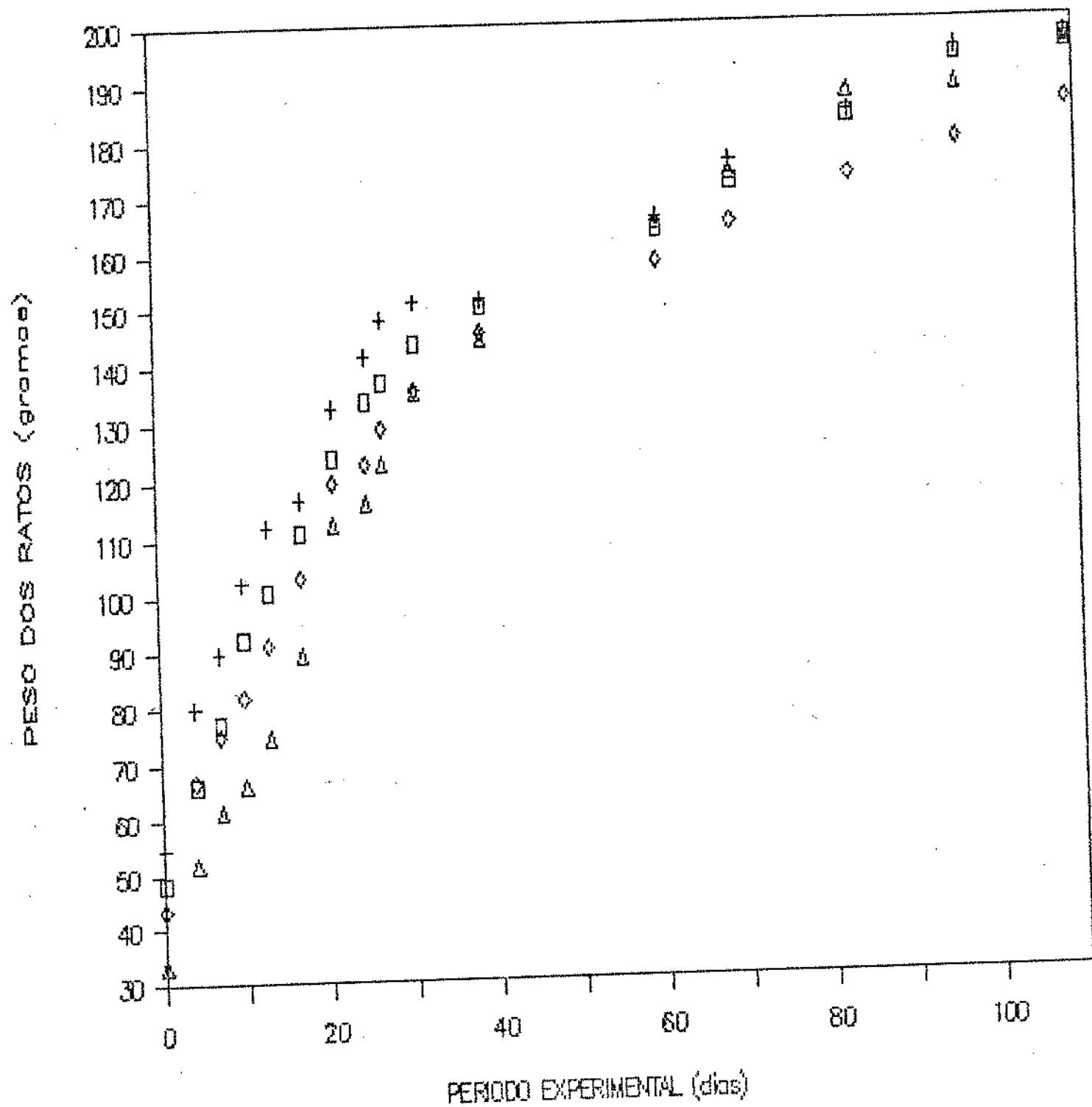


FIGURA 6 - Curvas de ganho de peso para ratos Wistar fêmeas submetidos à ingestão de Eritrosina. Controle (□) 107 mg/kg p.c. (Δ); 556 mg/kg p.c. (◇); 1193 mg/kg p.c. (+).

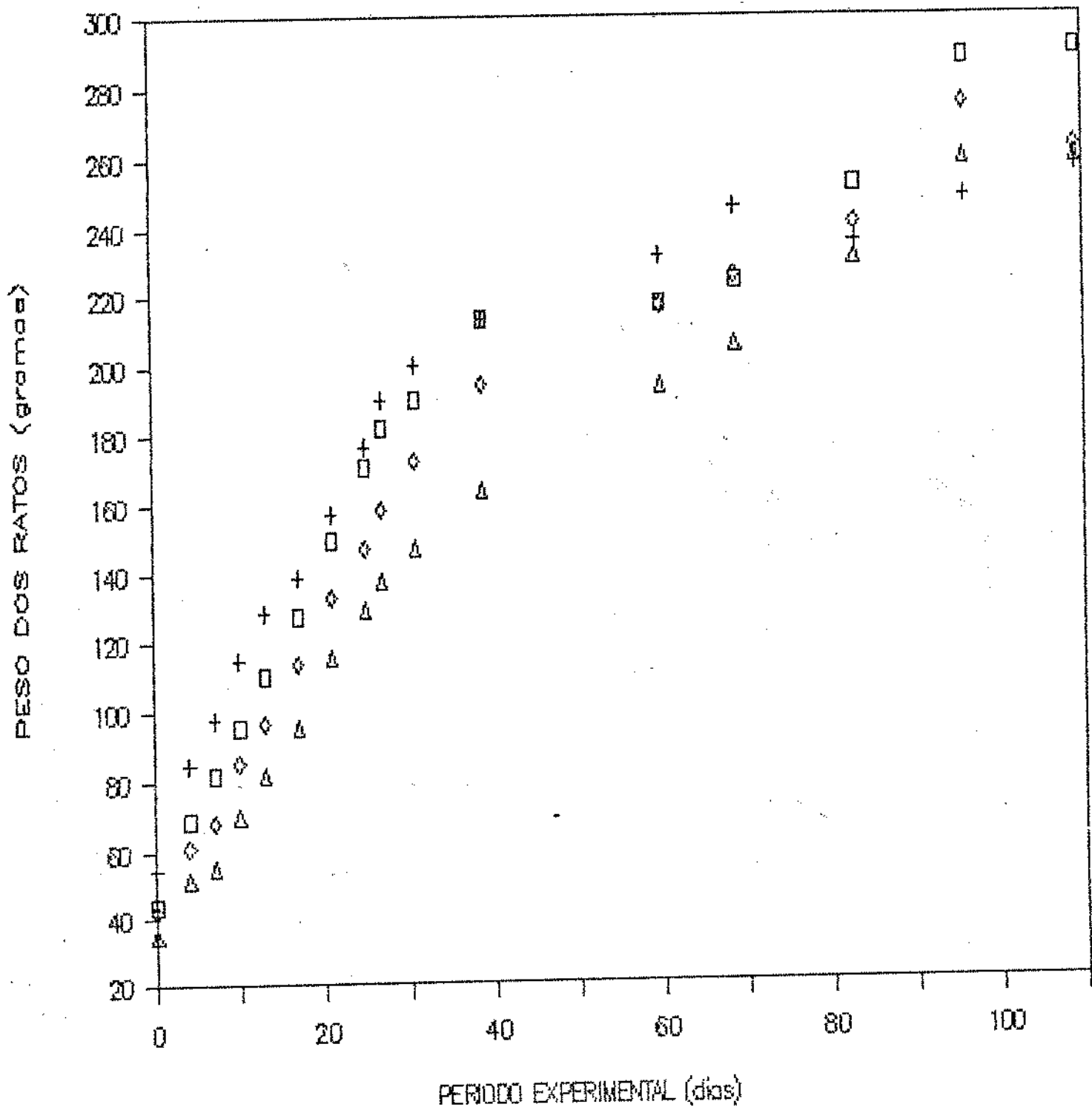


FIGURA 7 - Curvas de ganho de peso para ratos Wistar machos submetidos à ingestão de Eritrosina. Controle (□) 91 mg/kg p.c. (Δ); 527 mg/kg p.c. (◇); 1086 mg/kg p.c. (+).

TABELA 6 - Análise de Variância para Ganho de Peso de Ratos Wistar Submetidos à Ingestão do Corante Eritrosina

MACHOS

	SD	GL	QM	F
TEMPO	2295,73	14	163,98	
TRATAMENTOS	61,65	3	20,55	F = 0,41
ERRO	2095,60	42	49,89	
TOTAL	4452,98	59		

FEMEAS

	SD	GL	QM	F
TEMPO	1219,73	14	87,12	
TRATAMENTOS	19,73	3	6,58	F = 0,55
ERRO	504,27	42	12,01	
TOTAL	1743,73	59		

F tabelado para nível de significância de 5% = 2,84

1% = 4,29

2.2- Consumo de Ração e de Corante:

Na Tabela 7, estão apresentados os dados relativos à análise de variância do consumo semanal de ração dos ratos. Os resultados obtidos indicam que não houve diferença significativa, à nível de 5%, entre os grupos submetidos às diferentes ingestas de Eritrosina e o grupo controle, tanto para machos quanto para fêmeas.

Os resultados obtidos relativos ao consumo real de corante estão apresentados na Figura 8, as quais indicam que o consumo de Eritrosina manteve-se uniforme durante todo o período de experimentação (90 dias). O consumo real médio para os ratos machos foi de 91, 527 e 1086 mg/kg p.c. e para as fêmeas de 107, 556 e 1193 mg/kg p.c., relativos, respectivamente, ao consumo teórico de 100, 500 e 1000 mg/kg p.c.

TABELA 7 - Análise de Variância para Consumo Semanal de Ração de Ratos Wistar Submetidos à Ingestão do Corante Eritrosina

MACHOS

	SQ	GL	QM	F
TEMPO	74,61	3	24,87	
TRATAMENTOS	14,52	3	4,84	F = 1,86
ERRO	23,42	9	2,60	
TOTAL	112,55	15		

FEMEAS

	SQ	GL	QM	F
TEMPO	21,23	3	7,08	
TRATAMENTOS	2,88	3	0,96	F = 2,52
ERRO	3,43	9	0,38	
TOTAL	27,55	15		

F tabelado para nível de significância de 5% = 3,86

1% = 6,99

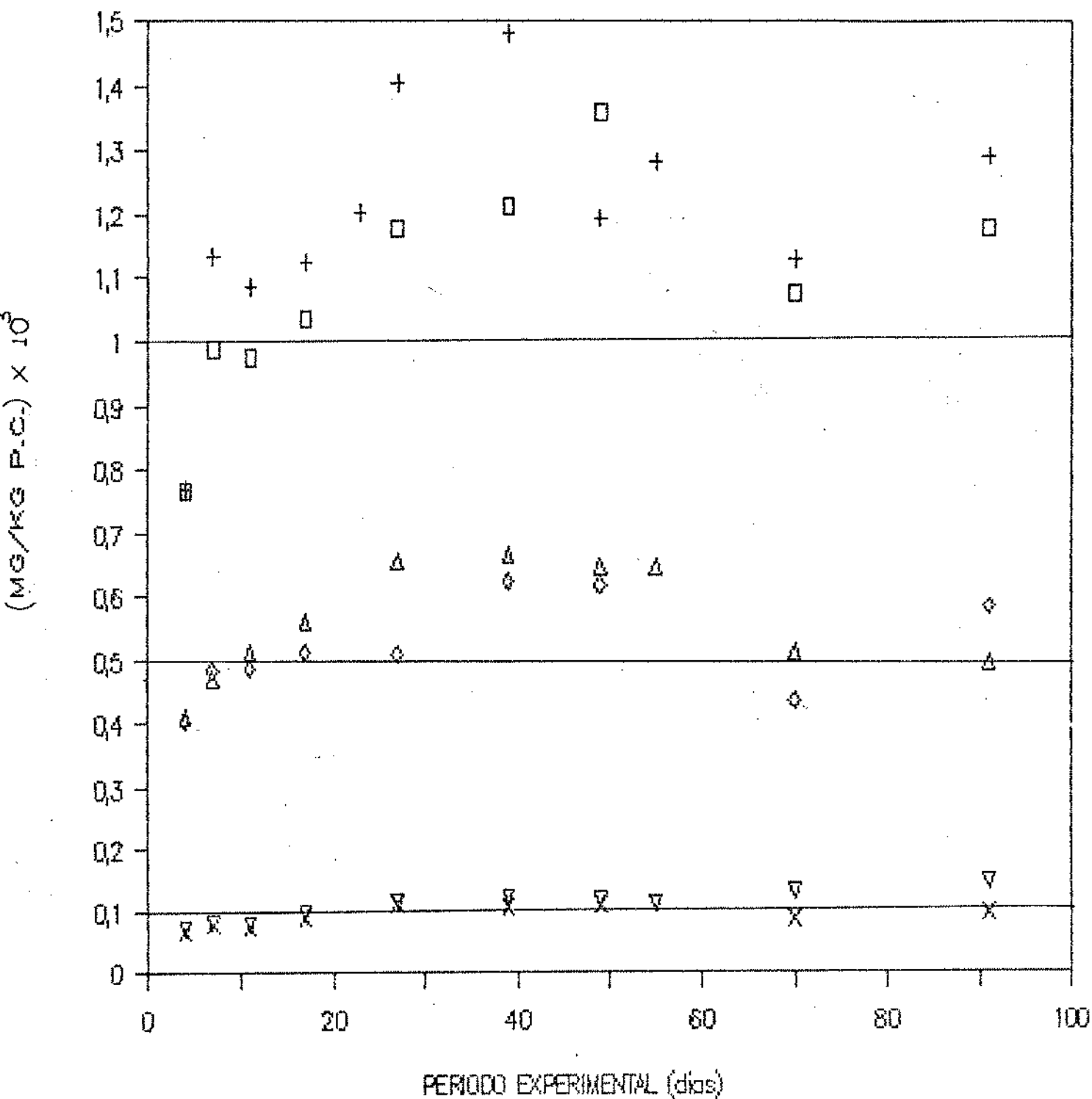


FIGURA 8 - Curvas de consumo real de corante Eritrosina para ratos Wistar. 100 mg/kg p.c. (♂ ×; ♀ ▽); 500 mg/kg p.c. (♂ ◇; ♀ Δ); 1000 mg/kg p.c. (♂ □; ♀ +)

2.3- Avaliação da Função Respiratória Mitochondrial de Ratos Wistar Submetidos à Ingestão do Corante Eritrosina

A inibição da velocidade de consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas verificada em presença de corantes orgânicos sintéticos artificiais não pode ser considerada como um efeito adverso dos referidos compostos a menos que se disponham de dados que comprovem o mesmo efeito "in vivo", isto é, após sua administração a animais experimentais e consequente avaliação de sua função respiratória mitochondrial.

Os dados obtidos para a avaliação da função respiratória mitochondrial de ratos Wistar submetidos à diferentes ingestas do corante Eritrosina, estão apresentados na Tabela 8. Os resultados da análise de variância, apresentados nas Tabelas 9 e 10 mostram que o corante não provoca alteração significativa, à nível de 5%, na velocidade de consumo de oxigênio no estado III desacoplado, entre os diferentes grupos quando comparados separadamente por sexo e por nível de ingesta. Este efeito foi verificado tanto em presença de substrato respiratório de sítio I, α -cetoglutarato, como de sítio II, succinato.

A incapacidade demonstrada pela Eritrosina em reproduzir "in vivo" o efeito verificado "in vitro", pode ser explicada pela sua baixa absorção após administração por via oral, uma vez que, segundo Daniel, 1962, a excreção do composto está na faixa de 55-74% (Daniel, 1962). Deve-se ressaltar ainda todo o sistema de proteção que possui o animal intacto, como membranas celulares e enzimas encarregadas da biotransformação de compostos xenobióticos, o qual deve propiciar que a quantidade de corante

TABELA 8 - Velocidade de consumo de oxigênio no estado III desacoplado, na presença de α -cetoglutarato e de succinato, de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar submetidos à ingestão de Eritrosina

NIVEL REAL DE INGESTAO	VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGENIO	
	α -CETOGLUTARATO	SUCCINATO
FEMEAS		
0	104,8	153,1
107	103,9	182,5
556	86,9	153,9
1193	101,4	158,0
MACHOS		
0	118,6	195,6
91	92,3	175,3
527	79,3	152,2
1086	107,1	177,7

NIVEL REAL DE INGESTAO - Quantidade de corante consumida por cada grupo de ratos, expressa em miligramas de corante por kilograma de peso corpóreo médio dos ratos de cada grupo.

VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGENIO NO ESTADO III, DESACOPLADO - expressa em nanograma-átomo de Oxigênio por minuto por miligramma de proteína mitocondrial.

TABELA 9 - Análise de variância para velocidade de consumo de oxigênio no estado III, desacoplado, de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos fêmeas Wistar submetidos à ingestão de Eritrosina

SUBSTRATO RESPIRATORIO - α -CETOGLUTARATO

	SD	GL	QM	F
FATOR	1709	3	570	0,55
ERRO	30287	29	1044	
TOTAL	31996	32		

SUBSTRATO RESPIRATORIO - SUCCINATO

	SD	GL	QM	F
FATOR	4329	3	1443	0,49
ERRO	85756	29	2957	
TOTAL	90085	32		

F tabelado para nível de significância de 5% = 2,93
 1% = 4,54

TABELA 10 - Análise de variância para velocidade de consumo de oxigênio no estado III, desacoplado, de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar machos submetidos à ingestão de Eritrosina

SUBSTRATO RESPIRATORIO - α -CETOGLUTARATO

	SQ	GL	QM	F
FATOR	5799	3	1933	1,68
ERRO	26403	23	1148	
TOTAL	32202	26		

SUBSTRATO RESPIRATORIO - SUCCINATO

	SQ	GL	QM	F
FATOR	6252	3	2084	0,54
ERRO	88850	23	3863	
TOTAL	95101	26		

F tabelado para nível de significância de 5% = 3,03

1% = 4,76

absorvida não atinja a mitocôndria em quantidade suficiente para produzir um efeito na organela semelhante aquele verificado "in vitro".

2.4- Avaliação do Efeito da Ingestão de Eritrosina no Peso de Órgãos de Ratos Wistar

Na Tabela 11, estão apresentados os pesos médios relativos dos órgãos dos animais submetidos a diferentes ingestas do corante Eritrosina. A análise de variância realizada, apresentada na Tabelas 12 e 13, para ratos fêmeas e machos, respectivamente, não revelou diferença significativa, a nível de 5%, entre o peso dos órgãos dos animais controle e os que ingeriram Eritrosina, com exceção do peso do baço dos ratos machos ($0,05 > P > 0,025$). Alteração semelhante foi observada por Hansen e col., 1973, em seu estudo sobre o efeito crônico (2 anos) da ingestão de Eritrosina em ratos. Essa alteração, no entanto, da mesma maneira que no presente estudo, não apresentou uma relação dose-resposta.

2.5- Avaliação histológica do efeito da ingestão de Eritrosina em ratos Wistar.

Sob o ponto de vista macroscópico, os órgãos avaliados dos animais utilizados neste estudo, apresentaram-se, na sua maioria, normais.

Um animal do grupo controle (grupo C1 - fêmeas) e um animal experimental (grupo A - 1000 mg/kg peso corpóreo - fêmeas) apresentaram cistos renais observados ao proceder-se a excisão do

TABELA 11 - Peso Relativo dos Órgãos dos Animais Submetidos a Ingestão do Corante Eritrosina

NIVEL DE INGESTÃO	FIGADO	BAÇO	RIM	BEXIGA
FEMEAS				
0	3,23	0,40	0,78	0,059
107	3,38	0,38	0,88	0,051
556	3,01	0,34	0,87	0,047
1193	3,43	0,37	0,85	0,058
MACHOS				
0	3,15	0,27	0,77	0,056
91	3,24	0,28	0,83	0,064
527	2,97	0,35	0,81	0,055
1086	2,90	0,30	0,82	0,073

PESO RELATIVO - Peso do órgão por kilograma de peso do animal ao final do período experimental. Pesos médios para cada grupo.

TABELA 12 - Análise de Variância para Peso Relativo dos Órgãos de Ratos Wistar Fêmeas Submetidos à Ingestão do Corante Eritrosina

- FIGADO

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$7,02 \times 10^{-5}$	3	$2,34 \times 10^{-5}$	1,05
ERRO	$58,05 \times 10^{-5}$	26	$2,23 \times 10^{-5}$	
TOTAL	$65,07 \times 10^{-4}$	29		

- BAÇO

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$1,17 \times 10^{-6}$	3	$3,92 \times 10^{-7}$	0,75
ERRO	$13,6 \times 10^{-5}$	26	$5,25 \times 10^{-7}$	
TOTAL	$14,8 \times 10^{-5}$	29		

- RINS

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$4,39 \times 10^{-6}$	3	$1,46 \times 10^{-6}$	0,29
ERRO	$1,29 \times 10^{-4}$	26	$4,97 \times 10^{-6}$	
TOTAL	$1,34 \times 10^{-4}$	29		

- BEXIGA

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$6,48 \times 10^{-2}$	3	$2,16 \times 10^{-2}$	0,86
ERRO	$6,55 \times 10^{-7}$	26	$2,52 \times 10^{-2}$	
TOTAL	$7,20 \times 10^{-7}$	29		

F tabelado para nível de significância de 5 % = 2,89

1 % = 4,64

TABELA 13 - Análise de Variância para Peso Relativo dos Órgãos de Ratos Wistar Machos Submetidos à Ingestão do Corante Eritrosina.

- FIGADO

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$3,60 \times 10^{-5}$	3	$1,20 \times 10^{-5}$	0,47
ERRO	$4,12 \times 10^{-4}$	16	$2,58 \times 10^{-5}$	
TOTAL	$4,48 \times 10^{-4}$	19		

- BAÇO

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$1,92 \times 10^{-6}$	3	$6,41 \times 10^{-7}$	3,75
ERRO	$2,73 \times 10^{-6}$	16	$1,71 \times 10^{-7}$	
TOTAL	$4,65 \times 10^{-6}$	19		

- RINS

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$1,09 \times 10^{-6}$	3	$3,63 \times 10^{-7}$	0,77
ERRO	$7,53 \times 10^{-6}$	16	$4,71 \times 10^{-7}$	
TOTAL	$8,62 \times 10^{-6}$	19		

- BEXIGA

	SQ	GL	QM	F
FATOR	$1,08 \times 10^{-7}$	3	$3,61 \times 10^{-8}$	0,50
ERRO	$1,15 \times 10^{-6}$	16	$7,17 \times 10^{-8}$	
TOTAL	$2,25 \times 10^{-6}$	19		

F tabelado para nível de significância de. 5 % = 3,24

1 % = 5,29

órgão. Porém, histologicamente estes órgãos se mostraram normais: tanto cortex como papila renal eram tecidos organizados e funcionais. Os cistos alteraram apenas a relação da papila renal com a córtex, separando-as em maior extensão do que ocorre normalmente no rato.

A maioria dos animais, 95%, tanto controles como experimentais, apresentaram pequenos nódulos (2 a 4 mm) esbranquiçados, internos à parede do intestino grosso e delgado. Estes nódulos, que histologicamente, se revelaram como Placas de Peyer hipertrofiadas, eram bem circunscritos e sua primeira localização sempre foi à nível do ceco. Outros nódulos, em número total de dois a cinco, se localizavam ao longo dos intestinos, podendo ser encontrados até na porção terminal do intestino grosso.

Todos os animais submetidos a ingestão de Eritrosina, apresentaram a parede do tubo digestivo impregnada internamente pelo corante. Do estômago ao reto, as amostras de tecido antes de serem fixadas, foram lavadas com solução salina e ainda assim, as paredes continuavam coloridas pela Eritrosina. As fezes dos animais também apresentaram coloração vermelho profundo e todos os animais exibiam distensão do ceco.

Estas observações estão de acordo com os resultados relatados por Hansen e col., 1973 e Butterworth e col., 1976 que estudaram também o efeito da ingestão de diferentes doses de Eritrosina à níveis de 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 % na dieta, correspondendo, respectivamente, à ingestão de 0, 160, 330, 690 e 1750 mg/kg de peso corporeo dos ratos machos e à 0, 170, 370, 730

e 1470 mg/kg de peso corporeo dos ratos fêmeas utilizados nos experimentos.

A observação histológica dos órgãos revelou também que tanto em animais controles como em animais experimentais ocorria parasitismo da bexiga pelo Trichosomoides crassiscanda (Trichinelloidea).

Tanto nos animais controle quanto nos expostos à Eritrosina, observou-se uma generalizada infiltração linfocitária, à nível pulmonar, hepático, submucosa do tubo digestivo (do esôfago ao reto) e eventualmente renal. Na submucosa do tubo digestivo esta infiltração era sempre acompanhada por numerosos eosinófilos. Estas respostas de natureza inflamatória encontradas nos animais, podem ser atribuídas ao parasitismo pelo Trichosomoides crassiscanda.

Todos os baços, dos animais controle e dos submetidos à ingestão de Eritrosina, apresentavam polpa branca com sinais de hiperatividade e na polpa vermelha eram abundantes os depósitos de hemossiderina.

Todos os órgãos retirados dos animais utilizados neste estudo foram avaliados ao Microscópio Óptico, não tendo sido verificada nenhuma anomalia tissular. Para melhor ilustração, nas Figuras 9 e 10 estão apresentadas, respectivamente, fotomicrografias do trato gastrointestinal e das glândulas anexas, sistema linfocitário e pulmão dos ratos submetidos à ingestão aproximada de 1000 mg de Eritrosina/kg p.c.

- FIGURA 9.1- Esôfago, porção média, sem alterações de qualquer natureza (aumento 500 vezes).
- FIGURA 9.2- Estômago, região fúndica: mucosa gástrica íntegra sem sinais de erosão (aumento 120 vezes).
- FIGURA 9.3- Intestino delgado, jejuno. Mucosa jejunal bem preservada. Células de descamação em quantidade normal (aumento 120 vezes).
- FIGURA 9.4- Intestino delgado, íleo. As vilosidades cortadas transversalmente apresentam-se íntegras. Ausência de infiltrados na submucosa (aumento 120 vezes).
- FIGURA 9.5- Detalhe da figura 9.4: vilosidades cortadas transversalmente, demonstram a perfeita integridade do epitélio (aumento 500 vezes).
- FIGURA 9.6- Intestino grosso, ceco. Observação panorâmica do ceco. A pequena infiltração linfocitária é a esperada para esta porção do tubo digestivo (aumento 50 vezes).

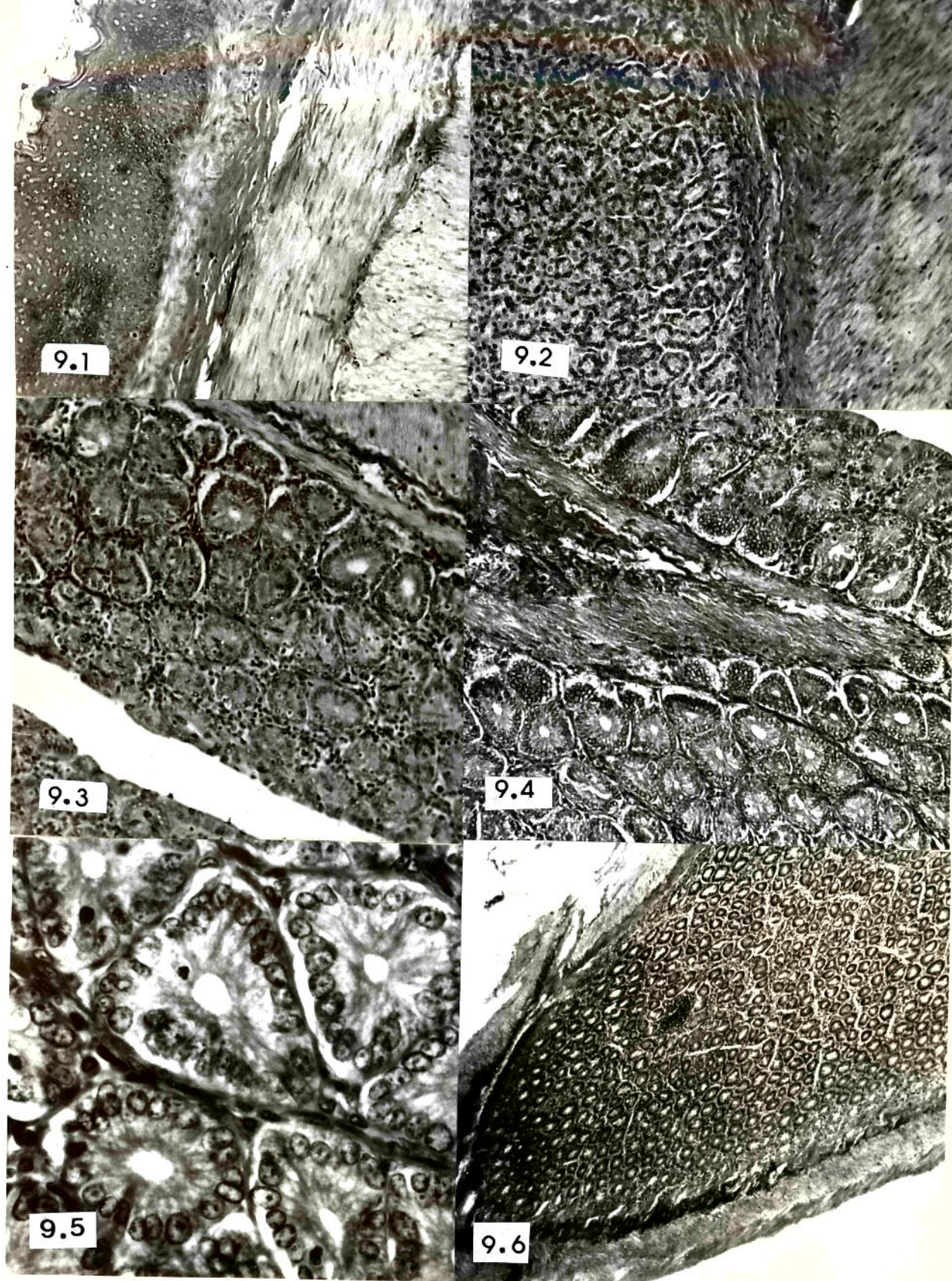


FIGURA 9 - Fotomicrografias de cortes histológicos (coloração Hematoxilina e Eosina) do trato gastrointestinal de ratos submetidos à ingestão de 1000 mg de Eritrosina/Kg de peso corpóreo.

FIGURA 10.1- Pâncreas exócrino: ácinos bem configurados, exibindo a característica basofilia (aumento 120 vezes).

FIGURA 10.2- Pulmão: configuração normal. Não ocorrem infiltrações, assim como as células de Kupfer não exibem fagocitose hiperativada (aumento 120 vezes).

FIGURA 10.3- Baço: nódulos com coroa linfocitária ativa, os quais, entretanto, foram também verificados nos animais controle (aumento 120 vezes).

FIGURA 10.4- Baço: para efeito comparativo, apresenta-se outros nódulos com estadiamento distinto da figura anterior. Ambas as figuras caracterizam um órgão linfóide ativo e normal (aumento 120 vezes).

FIGURA 10.5- Rim: região cortical. Glomérulos, túbulos proximais e distais normais (aumento 120 vezes).

FIGURA 10.6- Pulmão: dois bronquíolos propriamente ditos e artéria pulmonar. Pequeno infiltrado linfocitário adjacente aos primeiros. Tais infiltrados ocorreram tanto nos animais controle como naqueles submetidos a diferentes ingestões de eritrosina (aumento 120 vezes).

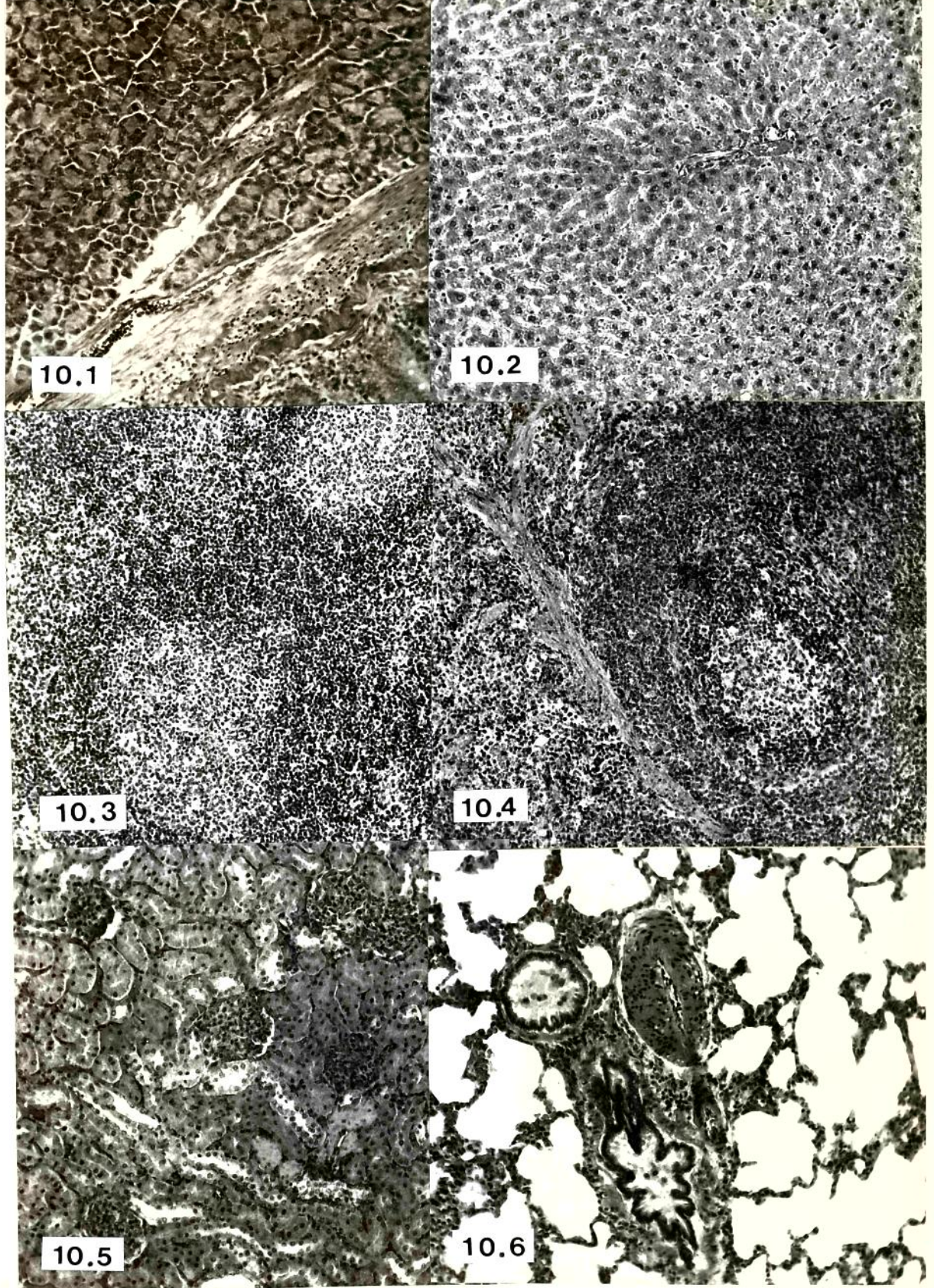


FIGURA 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos (coloração Hematoxilina e Eosina) das glândulas anexas, do sistema linfocitário e do pulmão de ratos submetidos à ingestão de 1000 mg de Eritrosina por Kg de peso corpóreo.

V- CONCLUSOES

Os resultados obtidos em nosso trabalho permitem-nos concluir que:

- Todos os corantes orgânicos sintéticos artificiais testados inibem, a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado e de rim de ratos Wistar, sendo que esta inibição ocorre em ordem decrescente para os corantes xantenos (Eritrosina), trifenilmetanos (Azul Brilhante), azos (Vermelho Sólido E, Escarlata GN, Ponceau 4R, Vermelho 40, Amarelo Crepúsculo, Laranja GGN e Amarelo de Tartrazina) e indigóides (Azul de Indigotina). Esta inibição ocorre tanto na presença de cetoglutarato (substrato respiratório de sítio I) quanto de succinato (substrato respiratório de sítio II), conforme verificado através da diminuição da velocidade de consumo de oxigênio no estado III, desacoplado.

- A administração de Eritrosina nas doses aproximadas de 0, 100, 500 e 1000 mg/kg p.c. a ratos Wistar, machos e fêmeas, durante 90 dias, não provoca diferença significativa, a nível de 5%, no ganho de peso dos animais, assim como não afeta a função respiratória mitocondrial dos mesmos.

- O peso relativo dos órgãos (fígado, rins, baço e bexiga) dos ratos Wistar submetidos à ingestão de Eritrosina, não apresenta diferença significativa, a nível de 5%, quando comparado com os animais controle, com exceção do peso do baço dos ratos machos ($0,05 > P > 0,025$).

- Não ocorrem alterações morfológicas nos órgãos (pulmão, fígado, estômago, baço, intestino grosso e delgado, bexiga, rins e adrenais) dos animais submetidos à ingestão de Eritrosina, com exceção de distensão do ceco. De maneira semelhante, a avaliação ao Microscópio Óptico dos órgãos mencionados não revela nenhuma anomalia tissular.

Finalmente, o conjunto de resultados obtidos permite afirmar que, nas condições experimentais utilizadas, a Eritrosina não afeta a função respiratória mitocondrial de ratos Wistar, apesar de apresentar inibição da mesma nos estudos realizados com a mitocôndria isolada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARMITAGE, P. - Statistical Methods in Medical Research Third ed.
London, Blackwell Sc. Pub., 1974. p.189-216.
- BERDICK, M. - Safety of food colors In: HATHCOCK, J.N. ed.
Nutritional toxicology New York, Academic Press, 1982
v.1, p.383-434
- BOWIE, W.C.; WALLACE, W.C.; LINDSTROM, H.V. - Some clinical
manifestations of erythrosin in rats. Fedn. Proc. Fedn. Am.
Soc. Exp. Biol. Med. 124: 556-563, 1966.
- BRASIL. Leis e Decretos. Dec. Lei 50040 de 20/01/1961. D.O.U.
28/01/1961.
- BRASIL. Leis e Decretos. Dec. Lei 55871 de 26/03/1965. D.O.U.
29/04/1965.
- BRASIL. Leis e Decretos. Resolução 04 de 24/11/1988. D.O.U. -
19/12/1988.
- BROWN, J.P.; DORSKY, A.; ENDERLIN, F.E.; HALE, R.L. - Synthesis
of (14)C-labelled FD&C blue no.1 and its intestinal
absorption and metabolic fate in rats. Food Cosmet. Toxicol.
18: 1-5, 1979.
- BUTTERWORTH, K.R.; GAUNT, I.F.; GRASSO, P.; GANGOLLI, S.D. -
Acute and short-term toxicity studies on erythrosine BS in
rodents. Food Cosmet. Toxicol. 14: 525-531, 1976.

- BUTTERWORTH, K.R.; GAUNT, I.F.; GRASSO, P.; GANGOLLI, S.D. -
Short-term toxicity of erythrosine BS in pigs. Food Cosmet.
Toxicol. 14: 533-536, 1976.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. - The respiratory chain and oxidative
phosphorylation. Adv. Enzymol. 17: 65-134, 1965.
- COULSON, J. - Synthetic organic colours for food In:
WALFORD, J. ed. Developments in food colours = 1. London,
Applied Science, 1980, p. 47-94.
- DANIEL, J.W. - The excretion and metabolism of edible food
colors. Toxicol. Appl. Pharmacol. 4: 572-594, 1962.
- DRAKE, J.J.-P. - Food colours - harmless aesthetics or
epicurean luxuries? Toxicol. 5: 3-42, 1975.
- DUBOSE, C.N.; CARDELLO, A.V.; MALLER, D. - Effects of colorants
and flavorants on identification, perceived flavor intensity
and hedonic quality of fruit-flavored beverages and cake
J. Food Sci. 45: 1393-1415, 1980.
- FAO/WHO - Toxicological evaluation of some food colours,
enzymes, flavour enhancers, thickening agents and certain
other food additives Rome, 1975. 10-21. (WHO Food
Additives Series, no. 6).
- FAO/WHO - Toxicological evaluation of certain food
additives. Rome, 1980. 5-17. (WHO Food Additives Series,
no. 15).

- FAO/WHO - Toxicological evaluation of certain food additives. Rome, 1982. 246-254. (WHO Food Additives Series, no. 17).
- FAO/WHO - Toxicological evaluation of certain food additives and food contaminants. Rome, 1983. (WHO Food Additives Series, no. 18).
- FAO/WHO - Toxicological evaluation of certain food additives and food contaminants. Rome, 1984. 50-66 (WHO Food Additives Series, no. 19).
- FAO/WHO - Environmental health criteria 70 - Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. Rome, 1987. 110-112.(a)
- FAO/WHO - Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Rome, 1987. 86-109. (WHO Food Additives Series, no 21).(b)
- FOWLER, B.A.; LUCIER, G.W.; HAYES, W. - Organelles as tools in toxicology. In: HAYES, W. ed. Principles and methods of toxicology. New York, Raven Press, 1982. p.635-657
- GALLO, M.A.; BACHMAN, E.; GOLBERG, L. - Mitochondrial effects of 2,6-dichloro-4-nitroaniline and its metabolites. Toxicol.Appl. Pharmacol. 35 : 51-61, 1976.
- HANSEN, W.H.; ZWICKEY, R.E.; BROUWER, J.B.; FITZHUGH, O.G. Long-term toxicity studies of erythrosine. I- Effects in rats and dogs. Food Cosmet. Toxicol. 11: 527-534, 1973.

- HANSEN, W.H.; DAVIS, K.J.; GRAHAM, S.L.; PERRY, C.H.; JACOBSON, K.H. - Long-term toxicity studies of erythrosine. II- Effects on haematology and thyroxine and protein-bound iodine in rats. Food Cosmet. Toxicol. 11: 535-545, 1973.
- IFT Expert Panel on Food Safety and Nutrition. - Food colors. Food Technol. 34 (7): 77-84, 1980.
- IFT Expert Panel on Food Safety and Nutrition. - Food Colors. Food Technol. 40 (7): 49-56, 1986.
- KIES, M.W. & MURPHY, J.B. - Intracellular distribution of enzymes. V- Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J. Biol. Chem. 183: 123-134, 1950.
- KRONENBERG, J. & BRABEC, M.J. - "In vitro" effects of OBPA on mitochondria. Toxicol. Appl. Pharmacol. 62: 282-287, 1982.
- LEHNINGER, A.L. - Principios de bioquímica. São Paulo, Savier, 1986. p. 333-362.
- LOCKEY, S.D. - Hypersensitivity to tartrazine (FD&C Yellow no.5) and other dyes and additives present in foods and pharmaceutical products. Ann. Allergy 38: 206-210, 1977.
- MANRING, J.A. & MORELAND, D.E. - Effects of chlordecone on isolated rat liver mitochondria. Toxicol. Appl. Pharmacol. 59: 483-488, 1981.

- MEYER, O. & HANSEN, E.V. - A study of the embriotoxicity of the ponceau 4R in rats. Toxicol. 5: 201-207, 1975.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen tranfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature, Lond. 191: 144-148, 1961.
- MITCHELL, P. - Chemiosmotic coupling in oxidation and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. 41: 445-502, 1966.
- MORELAND, D.E. - Effects of toxicants on oxidative and photophosphorylation In: HODGSON, E. & EGUTHRIE, F.E., eds. Introduction to biochemical toxicology. New York, Elsevier, 1984. p. 245-255.
- NAIN, M.P. - Toxicologie experimentale du colorant tartrazine. Méd. et Nut. 5 : 365-374, 1983.
- NODA, K.; YOSHIMOTO, M.; HATANO, S.; WATANABE, T. - Effect of coal tar dyes on oxygen uptake in mitochondria isolated from rat liver. J. Food Hyg. Soc. Japan. 26: 203-207, 1985.
- PHILLIPS, J.C.; MENDIS, D.; EASON, C.T.; GANGOLLI, S.D. - The metabolic disposition of 14(C)labelled green S and brilliant blue FCF in the rat, mouse and guinea-pig. Food Cosmet. Toxicol. 18: 7-13, 1979.
- RUDDICK, J.A.; CRAIG, J.; STRAVIC, B.; WILLIES, R.F.; COLLINS, B. - Uptake, distribution and metabolism of 14(C)labelled amaranth in the female rat. Food Cosmet. Toxicol. 17: 435-442,

1979.

- SINHASENI, P.; D'ALECY, L.G.; HARTUNG, R.; SHLAFER, M. - Respiratory effects of hexachlorocyclopentadiene on intact rainbow trout and on oxidative phosphorylation of isolated trout heart mitochondria. Toxicol. Appl. Pharmacol. 67: 215-223, 1983.
- VERCESI, A.E.; REYNAFARJE, B.; LEHNINGER, A.L. - Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca(2+) uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 253: 6379-6385, 1978.
- VETTORAZZI, G. - Toxicological profiles of food colorants. In: Handbook of international food regulatory toxicology. Lancaster, MTP Press, 1981. v.2, p.13-86.
- WALKER, R. - Metabolism of azo compounds: a review of the literature. Food Cosmet. Toxicol. 8: 659-679, 1970.