

Avaliação do efeito carcinogênico do corante amaranth ou bordeaux por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*

Evaluation of the carcinogenic effect of amaranth or bordeaux dye by testing for epithelial tumor clones (ETT) in Drosophila melanogaster

DAYANE MOREIRA DA SILVA
Discente de Nutrição (UNIPAM)
E-mail: dayanemoreira@unipam.edu.br

JEYSON CESARY LOPES
Professor orientador (UNIPAM)
E-mail: jeisoncl@unipam.edu.br

Resumo: O câncer é causado por diversos fatores externos ou internos e é uma das principais doenças responsáveis pela morte de inúmeras pessoas, por isso é considerado um problema de saúde pública. Devido aos impactos na população, muitas pesquisas científicas tentam evidenciar substâncias que possam trazer ou não esse malefício. O Bordeaux ou amaranth é um corante alimentício que causa controvérsias no meio acadêmico devido ao seu possível efeito carcinogênico. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi analisar o efeito carcinogênico do amaranth, por meio do teste ETT em *Drosophila melanogaster*. Para esse teste, foram utilizados o controle positivo (Doxorrubicina) e o controle negativo (Água osmose reversa) e três concentrações do Bordeaux associado a DXR. Os descendentes tratados com o corante associado a Doxorubicina apresentaram valores menores de tumores ao serem comparados com o controle positivo. Em conclusão, o Bordeaux nas presentes concentrações foi capaz de reduzir significativamente os danos causados pela DXR, demonstrando efeito modulador da ação carcinogênica induzida por esse composto.

Palavras-chave: Bordeaux. Câncer. *Wts*.

Abstract: Cancer is caused by several external or internal factors and is one of the main diseases responsible for the death of countless people, so it is considered a public health problem. Due to the impacts on the population, many scientific researchers try to evidence substances that may or may not bring this harm. Bordeaux or amaranth is a food coloring that causes controversy in academia because of its possible carcinogenic effect. Thus, this study's aim was to analyze the amaranth carcinogenic effect through the ETT test in *Drosophila melanogaster*. For this test, the positive control (Doxorubicin) and the negative control (Reverse Osmosis Water), and three concentrations of Bordeaux associated with DXR were used. The offspring treated with the coloring associated with Doxorubicin showed lower values of tumors when compared to the positive control. In conclusion, Bordeaux, at these concentrations, was able to reduce the damage caused by DXR, demonstrating a modulating effect of the carcinogenic action induced by this compound.

Keywords: Bordeaux. Cancer. *Wts*.

1 INTRODUÇÃO

Na maioria dos casos, o câncer acontece devido a causas externas, estimuladas pelos hábitos alimentares e pelo estilo de vida do paciente. No entanto, “o câncer possui razões externas (presentes no meio ambiente) e internas (como hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas) que podem interagir e ocasionar o câncer” (INCA, 2019). Além disso, ele é uma das doenças que mais mata no mundo e é considerado um problema de saúde pública (PEREIRA *et al.*, 2020).

Existem inúmeros tipos de câncer e essa enfermidade surge com uma alteração no DNA celular, que não permite que as células recebam informações corretas para as suas funções (INCA, 2019). A carcinogênese dispõe de três estágios: iniciação, promoção e a progressão. A iniciação ocorre com a ativação de oncogênese, enquanto a promoção trata de uma propagação lenta das células clonadas “iniciadas”. Já a fase da progressão ocorre, por meio, de outra mutação. Porém, esse processo independe de estímulos e é irreversível (CARNEIRO; PINTO; PAUMGARTTEN, 1997).

Os corantes alimentares são substâncias utilizadas pela indústria alimentícia e possuem a capacidade de adicionar cor aos produtos. Dessa forma, esses aditivos garantem que os alimentos sejam aceitos com mais facilidade pelo mercado consumidor, que prefere comidas coloridas e com atrativos visuais. Porém, a utilização de aditivos em alimentos gera discussões na literatura, pois existem divergências baseadas entre a necessidade e a segurança daqueles que consomem esses produtos (ANASTÁCIO *et al.*, 2016).

A nocividade dos corantes, em especial os sintéticos, causa discordâncias entre os pesquisadores, pois grande parte dos estudos são antigos, insuficientes e contraditórios (ANASTÁCIO *et al.*, 2016). Ademais, entre os grupos de corantes sintéticos mais utilizados, encontram-se os azoicos, que causam uma apreensão devido aos seus efeitos na saúde humana e ambiental (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

O corante artificial vermelho Bordeaux ou amaranto é um dos azoicos mais utilizados pela indústria em diversos alimentos processados. Essas substâncias são degradadas pela microbiota intestinal e é possível que o efeito cancerígeno seja devido à degradação de corantes do grupo azo (LOCATELLI, 2008). A genotoxicidade se refere a substâncias que são capazes de causar uma alteração na informação genética da célula, que pode causar danos ao DNA e o desenvolvimento de câncer. Em contraponto a isso, “os corantes são considerados os aditivos alimentares mais genotóxicos” (LOCATELLI, 2008). Logo as células cancerosas são caracterizadas devido a sua propagação descontrolada, o que ocasiona problemas para o organismo (MIRZOYAN *et al.*, 2019).

Apesar das diferenças anatômicas entre moscas e humanos, a *Drosophila Melanogaster* possui um papel importante para entender alguns processos que ocorrem com o câncer. Além disso, resistência a apoptose, infecção tumoral e evasiva do sistema imunológico juntamente com a instabilidade genômica são características cancerígenas que foram descritas utilizando as *Drosophilas* (MIRZOYAN *et al.*, 2019). Dessa forma, ela pode ser manipulada em testes de detecção de tumor epitelial e deve detectar o possível potencial carcinogênico do corante amaranto.

Diante do exposto e com base na semelhança entre os genes humanos e os do inseto *Drosophila melanogaster*, é possível a realização de pesquisas para analisar a genotoxicidade de substâncias, avaliando seu potencial cancerígeno ou modular, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais - ETT.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito carcinogênico do corante Bordeaux, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

2.1.1 Doxorrubicina (DXR)

O Cloridrato de Doxorrubicina (DRX) conseguiu utilizar diferentes formas para propiciar o surgimento de danos ao DNA, devido às suas características quimioterápicas e recombinogênicas. É aplicado em pesquisas que utilizam o Teste para detecção de clones de tumor epitelial (ETT) para analisar as substâncias possivelmente cancerígenas (VASCONCELOS 2016). É apresentado sob forma de ampolas de 50 mg com os seguintes compostos em sua constituição: cloridrato de doxorrubicina, manitol e lactose. Em todos os experimentos, foram utilizados 25mL de água de osmose reversa como solvente para diluir 0,03538g de DXR, resultando em uma concentração de 0,4mM. A DXR foi o controle positivo (SILVA *et al.*, 2017).

2.1.2 Bordeaux

O corante vermelho Bordeaux S ou amaranto é bastante utilizado pela indústria alimentícia e possui uma cor vermelha que varia entre as tonalidades vermelho escuro, roxo e marrom. Para esse experimento, foram utilizadas 3 concentrações de Bordeaux (12,5; 25; 50mM) associadas a Doxorrubicina (0,4mM), sendo diluídas em água de osmose reversa, e 5 concentrações da própria substância sem o DXR (6,25; 12,5; 25; 50; 100mM). O controle negativo utilizado foi água de osmose reversa.

2.2 ETT - TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMOR EPITELIAL EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

2.2.1 Cruzamento e tratamentos

O cruzamento das *Drosophilas* enviadas pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) foi realizado por meio da coleta dos machos mwh/mwh e das fêmeas virgens wts/TM3. Ambos foram inseridos em frascos comportando o meio de cultura padrão de postura. Depois, as fêmeas foram transportadas para os meios de postura onde depositaram seus ovos. Dessa forma, foi possível obter larvas heterozigotas (wts/mwh+) que foram usadas no experimento.

Após 48±4 horas, as larvas foram banhadas na água destilada e transferidas para frascos de vidro contendo 1,5g de purê de batatas, juntamente com as concentrações necessárias do corante amarantho (1mg/ml até 5mg/ml). O Cloridrato de Doxorrubicina (DRX) foi utilizado na quantidade de 0,4mM para controle. As larvas foram expostas por aproximadamente 48 horas, até a mudança para o estágio de pupa. As moscas que emergiram foram coletadas e inseridas em frascos com etanol para serem avaliadas.

2.2.2 Análise das moscas

Durante o experimento, foram analisadas as moscas que apresentavam pelos longos e finos, devido ao gene *wts*, do qual são portadoras. Os indivíduos foram transferidos para uma placa escavada contendo glicerol (C₃H₈O₃) e foram examinados utilizando-se lupas estereoscópicas, pinças entomológicas e pincéis, para a visualização e contagem de tumores. A presença de tumores foi avaliada e registrada em uma planilha padrão.

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores no grupo experimental (nas concentrações testadas) e nos controles (negativo e positivo) foram calculadas utilizando-se o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância $\alpha=0,05$.

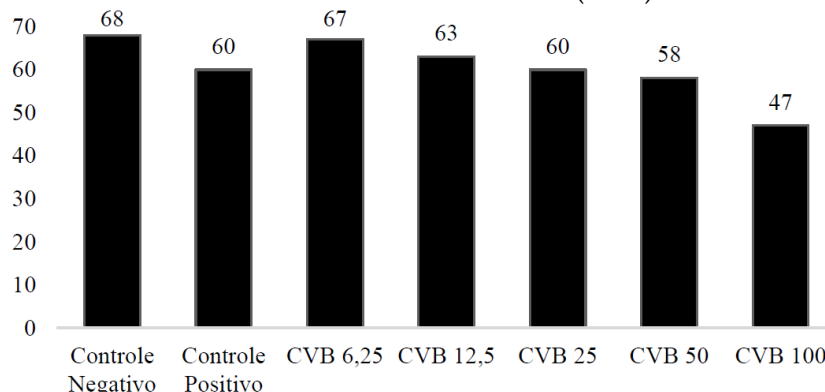
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Drosophila melanogaster*, é conhecida popularmente como a mosca-da-fruta ou mosca-da-banana. Pertence à família Drosophilidae, ordem Diptera, classe Insecta e é utilizada intensivamente em pesquisas em laboratórios, avaliando-se o potencial cancerígeno de substâncias, devido à sua alta fecundidade, curto tempo de vida e facilidade de criação (GULLAN; CRANSTON, 2017).

A *Drosophila* possui o genoma semelhante ao dos humanos e aproximadamente 75% dos genes causadores de enfermidades em humanos são análogos ao desse inseto (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016). Tal fato faz com que a mosca seja importante para as pesquisas relacionadas principalmente ao câncer. Logo, é possível avaliar o potencial carcinogênico das substâncias utilizadas, com base no ETT e na *Drosophila*, realizando-se uma avaliação referente à existência de tumores epiteliais nas moscas.

Para a análise estatística do experimento, é necessário um elevado número de indivíduos, com o propósito de avaliar a toxicidade do corante Bordeaux associado a Doxorrubicina. O gráfico 1 mostra o resultado obtido. Foi verificada elevada taxa de sobrevivência de moscas que atingiram a fase adulta e menor taxa de mortalidade: acima de 85% para os dois controles negativo e positivo e acima de 82% para as 3 concentrações associadas ao DXR (12,5; 25; 50Mm). As concentrações de 6,25 e 100 não foram utilizadas, devido a questões de relevância para o experimento. Logo, a associação não se mostrou tóxica nas concentrações em estudo.

Gráfico 1: Taxa de sobrevivência de expostas ao controle negativo (água osmose reversa), ao controle positivo (Doxorrubicina) a 0,4 mM e cinco concentrações do Corante Vermelho Bordeaux (CVB)



Fonte: dados da pesquisa, 2022.

Pelo teste ETT, foi possível verificar a frequência de tumores nos diferentes segmentos do corpo da *Drosophila melanogaster* em indivíduos tratados com diferentes concentrações da associação do Bordeaux com a Doxorrubicina, além do total de tumores encontrados nos controles positivo (DXR 0,4 mM) e negativo (água de osmose reversa). Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Frequência de clones de tumores observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com Doxorrubicina (0,4 mM) e diferentes concentrações de Corante Vermelho Bordeaux (CVB)

Tratamentos		Nº de indivíduos analisados	Número de tumores analisados						Total (Frequência de tumores)
Vermelho Bordeaux (mg/ml)	DXR (mM)		Olho s	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres	
Cont. Neg.		200	0	2	0	15	5	0	22 (0,11)
Cont. Pos.	0,4	200	2	0	4	105	22	0	133 (0,67)*
CVB 12,5		200	0	0	0	12	2	0	14 (0,07)
CVB 25		200	0	0	0	10	3	0	13 (0,06)
CVB 50		200	0	0	0	31	0	0	31 (0,16)
CVB 12,5	0,4	200	0	0	0	8	0	0	8 (0,04)**
CVB 25	0,4	200	0	0	0	4	0	0	4 (0,02)**
CVB 50	0,4	200	2	1	0	57	8	0	68 (0,34)**

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo ($p < 0,05$).

DXR, doxorrubicina.

Ao se analisarem os resultados do controle negativo, é possível identificar uma frequência de tumores de 0,11 nas moscas. Esse valor baixo demonstra um efeito modulador do corante amarantho. Um resultado semelhante foi identificado no teste do micronúcleo em células de intestino de camundongos, que não demonstrou diferença significativa quando comparado com o controle negativo. Os autores da pesquisa

sugeriram mecanismo de reparo de DNA para reduzir os danos causados pelo corante (POUL, 2009).

Nos descendentes que foram tratados com a Doxorubicina isolada na concentração de 0,4mM (controle positivo), foi obtida uma frequência de 0,67% de tumores. Além disso, o controle positivo do experimento respondeu de maneira significativa, o que enfatiza que a linhagem respondeu de forma correta e que os dados relacionados ao corante foram coletados corretamente e são válidos.

Outra pesquisa realizada por Shimada *et al.* (2010), consistia em alimentar camundongos com Bordeaux dissolvido a 10mg/kg de peso corporal do animal. Esse estudo concluiu que esse corante possui efeitos tóxicos para as células do cólon dos camundongos. Zhang e Ma (2013) são pesquisadores que demonstraram que o amaranto se uniu a moléculas de albumina humana e, assim, conseguiu alterar a sua interação com diferentes moléculas.

Em indivíduos tratados com o Bordeaux associado com Doxorubicina, foram observadas frequências totais de 0,04, 0,02 e 0,34, nas concentrações de 12,5, 25 e 50 mM, respectivamente. Foi observada redução estatisticamente significativa da frequência de tumores induzida por DXR. Tais resultados contrariam os resultados encontrados por Sarikaya, Selvi e Erkoç (2012) que, ao utilizarem o teste de Mutação e Recombinação Somáticas (SMART) para avaliação do efeito genotóxico do amaranto, descobriram que, em concentrações maiores ou iguais a 1,25 µg/mL, o corante induz mutações genéticas e efeitos genotóxicos.

Os trabalhos citados anteriormente corroboram os resultados aqui obtidos. Dessa forma, é possível que o corante seja genotóxico e citotóxico, mas, por ser muito citotóxico, ele consegue matar as células tumorais a tal ponto de não serem detectadas, uma vez que se tornou difícil a análise dos danos induzidos pelo mutágeno *Doxorubicina* em células somáticas de *D. melanogaster*.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais delineadas nesse estudo, pode-se concluir que o Bordeaux nas presentes concentrações foi capaz de promover a redução, de forma significativa, da frequência de tumores quando comparado ao controle positivo (frequência máxima possível de tumores). Portanto, mais estudos são necessários variando-se as doses, tempos de exposição e testes do sistema para avaliar com precisão o que desencadeou esse efeito na composição do amaranto.

REFERÊNCIAS

ANASTÁCIO, L. de B. *et al.* Corantes alimentícios amaranto, eritrosina B e tartrazina, e seus possíveis efeitos maléficos à saúde humana. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 16-30, 2016.

CARNEIRO, M. R. G.; PINTO, L. F. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 13, supl. 1, p. 27-38, 1997.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Importância, diversidade e conservação de insetos. *In: Insetos: fundamentos da entomologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap. 1, p. 1-18.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 35, p. 5-22, 2000.

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

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>.

LOCATELLI, K. M. de M.; NEPOMUCENO, J. C. **Detecção da genotoxicidade dos corantes artificiais Amarelo Tartrazina e Vermelho 40, pelo teste SMART de asa, em *Drosophila melanogaster***. 2008, 45 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

MIRZOYAN, Z.; SOLLAZZO, M.; ALLOCCAL, M.; VALENZA, A. M.; GRIFONI, D. G.; BELLOSTA, P. *Drosophila melanogaster*: a model organism to study cancer. **Front Genet.**, [S. l.], v. 10, 2019.

PEREIRA, I. *et al.* Consumo alimentar e estado nutricional de mulheres com câncer de mama em tratamento quimioterápico. **Colloquium Vitae**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 26-36, set./dez. 2020.

POUL, M.; JARRY, G.; ELHKIM, M. O.; POUL, J. M. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 443-448, 2009.

SARIKAYA, R.; SELVI, M.; ERKOÇ, F. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. **Chemosphere**, [S. l.], v. 88, p. 974-979, 2012.

SHIMADA, C. *et al.* Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. **The journal of toxicological sciences**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 547-554, 2010.

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Dis Model Mech.**, [S. l.], v. 9, p. 235-244, 2016.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, R. G. S. Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do levonorgestrel através do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em células de *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 200-217, 2017.

VASCONCELOS, M. A. **Avaliação do efeito carcinogênico de edulcorantes por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em *Drosophila melanogaster***. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

ZHANG, G.; MA, Y. Mechanistic and conformational studies on the interaction of food dye amaranth with human serum albumin by multispectroscopic methods. **Food Chemistry**, [S. l.], v.136, n. 2, p. 442-449, 2013.