


---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

---

**INVESTIGAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO  
AZOCORANTE COMERCIAL BDCP (BLACK  
DYE COMMERCIAL PRODUCT), ANTES E APÓS  
TRATAMENTO MICROBIANO, UTILIZANDO O  
SISTEMA TESTE DE *Allium cepa*.**

**BRUNA DE CAMPOS VENTURA**



Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Dezembro - 2009

**BRUNA DE CAMPOS VENTURA**

**“INVESTIGAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO AZOCORANTE  
COMERCIAL BDCP (BLACK DYE COMMERCIAL PRODUCT),  
ANTES E APÓS TRATAMENTO MICROBIANO, UTILIZANDO  
O SISTEMA TESTE DE *Allium cepa*.”**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
do campus de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção de título de Doutora em  
Ciências Biológicas (Biologia Celular e  
Molecular).**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. MARIA APARECIDA MARIN-MORALES**

**RIO CLARO  
Estado de São Paulo - Brasil  
Dezembro/2009**

**BRUNA DE CAMPOS VENTURA**

**“INVESTIGAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO AZOCORANTE  
COMERCIAL BDCP (BLACK DYE COMMERCIAL PRODUCT),  
ANTES E APÓS TRATAMENTO MICROBIANO, UTILIZANDO  
O SISTEMA TESTE DE *Allium cepa*.”**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
do campus de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção de título de Doutora em  
Ciências Biológicas (Biologia Celular e  
Molecular).**

**Comissão Examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Luíza Silveira Mello

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Angélica Maciel Martinho Ferreira

Prof. Dr. Edson Luís Maistro

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Ap. Marin-Morales (orientadora)

**Rio Claro, 17 de dezembro de 2009**

## TEU MILAGRE

Não dá pra se medir!  
Não dá pra comparar!  
A grandeza que vem de ti  
é mais que terra, céu e mar!  
Quando eu penso que sei,  
me surpreendo outra vez,  
com teu milagre, ó amado Deus!  
Prepara o meu coração!  
Me surpreenda mais uma vez!  
Mostra-me o teu poder,  
milagres que ainda não provei!  
Mostra-me, quero viver,  
o que sozinha eu não posso ver!

(Adelso Freire/Anderson Freire)

Aos meus pais, Carlos e Cláudia,

Ao meu esposo Rubens,

Aos meus avós, Francisco e Maria da  
Glória (*in memoriam*),

Agradeço por todo o amor e carinho  
demonstrados !!!

Com imensurável amor e gratidão,  
dedico-lhes esta vitória de valor  
inestimável para mim !!!

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

*A DEUS, Senhor Amado de minha vida, minha eterna gratidão por todas os dons que me concedeu! Graças, Pai, pela saúde, coragem e perseverança! Graças, Jesus Cristo, por ter permitido que eu O conhecesse ainda mais de perto, por meio da Sagrada Eucaristia! Graças, Espírito Santo, por ter conduzido meus passos e por ter soprado em meus ouvidos as mais sábias decisões! Graças, Santíssima Virgem Maria, por ter me acolhido como sua escrava de amor e por ter me ensinado a ser dócil às vontades de Deus, acolhendo, com alegria, os sonhos Dele para minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu verdadeiro amigo, por me conceder o dom da vida e da fé! Por permitir que eu realizasse esse grande sonho, iluminando cada instante dos meus dias!

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, pela orientação desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e, agora, pelo doutorado, responsável direta na minha formação profissional! Além disso, agradeço por ser minha querida madrinha e amiga, pessoa de caráter admirável e com quem sempre tenho aprendido a me tornar um ser humano melhor!

Aos técnicos de laboratório, Rogilene, Gérson e Sandra, que sempre estiveram dispostos a me ajudar nos experimentos realizados!

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação de “Biologia Celular e Molecular” da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, por terem contribuído, cada qual à sua peculiar maneira, na minha formação profissional!

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, pela inestimável assessoria nas pesquisas realizadas durante todo o doutorado, especialmente, nos ensaios com os microorganismos!

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi, por ter cedido os equipamentos e materiais utilizados no ensaio de FISH, e pelo importante auxílio no desenvolvimento da referida técnica.

À Secretaria de Educação do Estado de São Paulo, pela Bolsa de Doutorado concedida.

Aos colegas e amigos de pós-graduação, Bárbara, Bibi, Bob, Cintya, Daniela, Dânia, Davi, Eduardo Murakami, Fred, Janaína, Jaqueline, Livia, Márcia, Marielle, Matheus, Renata, Silvia, Tatiana, Thaís, por todos os momentos compartilhados! Em especial, às amigas Cintya, Márcia, Dânia, Renata, e ao amigo Eduardo, pelo auxílio nos experimentos e, simplesmente, pela valiosa amizade!

À Comunidade Canção Nova, instrumento de evangelização, com quem conversei, orei e cantei em muitos finais de semana no laboratório de mutagênese!

Aos irmãos da Comunidade Mariana “Alegra-te”, pelas valiosas orações!

À toda a minha família, avós, tios, primos, sogros e cunhados, pela torcida, incentivo, carinho e amor!

Aos meus irmãos, Carolina e Felipe, pela amizade, alegria e cumplicidade!

Ao meu querido esposo Rubens, pela presença marcante em todos os momentos, pela compreensão em situações de adversidade, e por simplesmente me amar como sou! Obrigada, meu amor, por você existir!

Aos meus amados pais, Carlos e Cláudia, a quem eu serei sempre grata por tudo o que fizeram e fazem por mim! Por me trazerem à vida, por confiarem em mim e investirem em meus sonhos! Muito obrigada por todo o apoio e amor, os quais foram ingredientes imprescindíveis para a conclusão do doutorado!



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. RESUMO</b>	01
<b>2. ABSTRACT</b>	03
<b>3. INTRODUÇÃO GERAL</b>	05
<b>4. OBJETIVOS</b>	07
<b>4.1. Objetivos Específicos</b>	08
<b>5. REVISÃO DA LITERATURA</b>	10
<b>5.1. Tratamento de efluentes têxteis</b>	15
<b>5.1.1. Biodegradação de azocorantes por bactérias</b>	17
<b>5.1.2. Biodegradação de azocorantes por leveduras</b>	19
<b>5.1.3. Biodegradação de azocorantes por fungos</b>	20
<b>5.2. Toxicidade de azocorantes</b>	21
<b>5.3. Sistema-teste vegetal</b>	25
<b>5.4. Testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade</b>	27
<b>5.4.1. Ensaio de aberrações cromossômicas</b>	28
<b>5.4.2. Bandamentos cromossômicos</b>	29
<b>5.4.2.1. Bandamento C</b>	29
<b>5.4.2.2. Bandamento RON</b>	30
<b>5.4.2.3. Bandamento por fluorocromos base-específicos</b>	31
<b>5.4.3. Hibridação <i>in situ</i></b>	32
<b>5.5. O uso do sistema-teste de <i>Allium cepa</i> em bandamentos cromossômicos</b>	32
<b>6. ARTIGO 1 - Utilização de técnicas citogenéticas para a identificação dos mecanismos de ação do azocorante BDCP em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>.</b>	34
<b>7. ARTIGO 2 - Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do corante comercial preto em células de <i>Allium cepa</i> (Asparaginales: Alliaceae), antes e após tratamento de biodegradação bacteriana.</b>	81
<b>8. ARTIGO 3 - Indução de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em células de <i>Allium cepa</i> expostas a um azocorante usado em indústria têxtil (BDCP), antes e após tratamento de biodegradação pela levedura <i>Candida viswanathii</i> (Saccharomycetales: Saccharomycetaceae).</b>	116
<b>9. ARTIGO 4 - Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do azocorante BDCP sobre células de <i>Allium cepa</i>, antes e após tratamento de biodegradação pelo fungo basidiomiceto <i>Phanerochaete chrysosporium</i>.</b>	146
<b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	174
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	177

## 1. RESUMO

Os azocorantes são substâncias químicas extremamente utilizadas em indústrias têxteis que podem induzir mudanças no material genético de organismos expostos, mesmo que essas alterações no DNA não se expressem de imediato. Foram avaliadas as citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 µg/L – na ausência dos microorganismos – e 50 e 200 µg/L – na presença dos microorganismos) do azocorante Black Dye Commercial Product (BDCP), antes e após tratamentos de biodegradação por diversos microorganismos (1. “Pool” de bactérias heterotróficas provenientes de uma estação de tratamento biológico de efluentes, 2. Levedura *Candida viswanathii*, e 3. Fungo Basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*), por meio de diferentes técnicas citogenéticas (coloração convencional, bandamento C, bandamento RON, bandamento por fluorocromos base-específicos CMA/DAPI e hibridação *in situ* fluorescente – FISH) aplicadas sobre o organismo teste *Allium cepa*. Pela técnica citogenética de coloração convencional, foi possível verificar que o corante, com e sem ação microbiana, induziu apoptose, necrose, células micronucleadas, aberrações cromossômicas e alterações nucleares. As aberrações cromossômicas e alterações nucleares foram visualizadas em todos os estágios do ciclo celular: na intérfase foram observados brotos nucleares e células poliplóides; na prófase, perdas de material genético; na metáfase, aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, C-metáfases e poliploidias; na anáfase e telófase, multipolaridades, pontes e perdas cromossômicas. Os brotos nucleares apareceram com maior frequência nas células submetidas aos testes do azocorante tratado com microorganismos, sendo que esse tipo de

alteração deve estar associado à presença dos metabólitos do corante. As frequências de micronúcleos e quebras cromossômicas, tipos de alterações consideradas “*endpoints*” de mutagenicidade, foram registradas para todos os tratamentos realizados com o corante, sendo sempre superiores às encontradas no teste controle negativo. Importante destacar a alta frequência de células em processo de morte, especialmente do tipo apoptótica, observada nos testes realizados com o BDCP tratado com leveduras e fungos, que deve estar associada à ação dos metabólitos gerados por esses microorganismos. Por meio dos bandamentos cromossômicos e da técnica de FISH, foi observado que o azocorante induziu alterações celulares e nucleolares, cujo efeito parece ocorrer em porções específicas dos cromossomos, sugerindo uma maior sensibilidade destas regiões ao BDCP. Pelas anormalidades celulares observadas, foi possível inferir tanto ação aneugênica como clastogênica para o químico estudado sem biodegradação, com certa predominância para a aneugenicidade. Os testes estatísticos mostraram uma relação diretamente proporcional entre a concentração e os efeitos tóxicos deste corante, onde a maior concentração induziu uma maior ação deletéria sobre as células de *Allium cepa*. Verificou-se que os metabólitos do azocorante, resultantes da biodegradação pelos microorganismos, induziram mais danos genotóxicos que o próprio corante. A redução na frequência total de células alteradas, após tratamentos de recuperação, especialmente para o período de 72 horas, indica que o *Allium cepa* apresenta a possibilidade de se recuperar dos danos induzidos pelo azocorante e pelos metabólitos derivados dos tratamentos microbianos, após a normalização das condições de exposição. No entanto, a maior concentração do corante, antes e pós biodegradação, induziu frequências significativas de alterações celulares, mostrando que o azocorante e os seus metabólitos podem ser altamente tóxicos nesta concentração, provavelmente por apresentar um potencial acumulativo sobre as células expostas. Pelos resultados do presente estudo, pode-se afirmar que o corante BDCP e seus metabólitos podem ser considerados contaminantes ambientais potencialmente perigosos para o ambiente e para toda a biota associada.

Palavras-chave: Corante têxtil, *Allium cepa*, aberrações cromossômicas, micronúcleos, degradação microbiológica, mutagênese.

## 2. ABSTRACT

Azo dyes are chemical substances extremely used by textile industries that may induce changes in the genetic material of exposed organisms, even if these changes in the DNA do not express themselves immediately. Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity evaluations of the different azo dye (BDCP) concentrations were performed (1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/L}$  – without microorganisms – and 50 and 200  $\mu\text{g/L}$  – with microorganisms), before and after biodegradation tests, using different microorganisms (1. Heterotrophic bacteria "pool" proceeding from an effluent biological treatment station, 2. *Candida viswanathii* - Yeast, and 3. *Phanerochaete chrysosporium* - Basidiomycet Fungi), by means the different cytogenetical assays (conventional staining, C-banding, RON-banding, CMA/DAPI banding and fluorescent *in situ* fluorescent hybridization), using *Allium cepa* as test organism. By the conventional staining cytogenetic assay, it was possible to verify that the azo dye induced apoptosis, necrosis, micronuclei, chromosome aberrations and nuclear alterations. The chromosome aberrations and nuclear alterations were visualized in all phases of the cell cycle: in the interphase were observed nuclear buds and polyploidized cells; in the prophase were observed genetic material losses; in the metaphase were observed chromosome adherences, chromosome losses, C-metaphases and polyploid cells; and in the anaphase and telophase were observed multipolar cells, chromosome bridges and chromosome losses. The frequencies of nuclear buds were the higher when the cells had been submitted to the azodye treated with microorganisms, suggesting that this kind of alteration must be associated to the presence of the azodye metabolites. The micronuclei and chromosome breaks frequencies,

considered mutagenicity endpoints, were verified for all treatments performed with the azodye, being always higher than the negative control. Important to highlight the high frequency of cells in death process, especially apoptosis, that was observed in the tests performed with the BDCP treated with yeast and fungi, that must be associated to the action of the metabolites originated by that microorganisms. By the chromosome bandings and by the FISH technique it was observed that the azo dye induced cellular and nucleolar alterations, whose effect occurs in specific chromosome regions, suggesting a higher sensitivity of these regions to the BDCP. By the cellular abnormalities observed, it was possible to infer both aneugenic and clastogenic actions for the chemical studied, with certain predominance for the aneugenicity. The statistical tests showed a directly proportional relationship between the concentration and the toxic effects of this azo dye, where the highest concentration induced a higher deleterious action on the *Allium cepa* meristematic cells. We verified that the azodye metabolites, resulting from the bacterial, yeast and fungi biodegradation, induced more genotoxic damage than the azodye. The reduction in the total frequency of altered cells, after recovery treatments, especially for the period of 72 hours, indicates that the *Allium cepa* presents the possibility to recuperate itself from the damages induced by the azo dye and its metabolites resulted by the microbial treatments, after the normalization of the exposition conditionals. Although, some azo dye dosages, before and after biodegradation process, induced significant frequencies of cell alterations, showing that the azo dye and its metabolites could be highly toxic in this concentration, probably because presents cumulative potential on the exposed cells. By the results observed in this study, we can affirm that the BDCP dye and its metabolites may be considered environmental contaminants potentially dangerous for the environment and for all the associated biota.

Keywords: Textile dye, *Allium cepa*, chromosome aberrations, micronuclei, microbial degradation, mutagenesis.

### **3. INTRODUÇÃO GERAL**

Durante as últimas décadas, tem aumentado o interesse dos pesquisadores em se detectar, conhecer e controlar os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas. Este interesse tem se intensificado pelos aumentos assustadores dos relatos de ação antropogênica sobre o meio ambiente. O crescimento da população humana e das atividades associadas com a industrialização, agricultura e urbanização tem contribuído para o prejuízo da biodiversidade e variabilidade genética, tendo como consequência o comprometimento de muitas espécies, inclusive o da espécie humana (SILVA; FONSECA, 2003).

A emissão de efluentes de indústrias têxteis tem sido uma das maiores preocupações do mundo moderno, pela grande poluição que promove nos recursos hídricos, fato este que pode causar sérios riscos aos ecossistemas aquáticos. Dentre os corantes lançados nos efluentes das indústrias têxteis, os azocorantes constituem uma das classes mais prejudiciais por serem altamente persistentes no meio aquático, em decorrência das suas composições químicas, que envolvem anéis aromáticos, ligações azóicas e grupos aminas. Além disso, estes compostos e seus resíduos apresentam um potencial tóxico capaz de provocar efeitos mutagênicos e carcinogênicos, somado também ao seu alto potencial bioacumulativo nas cadeias alimentares, o que pode levar a uma bioconcentração nos níveis tróficos mais altos da cadeia (JESUS, 2005).

A poluição do ambiente por produtos genotóxicos e mutagênicos afeta tanto os organismos diretamente expostos como também as suas gerações futuras. Os efeitos

genotóxico e mutagênico podem ser observados em plantas, animais e microorganismos, sendo, desta forma, importante o desenvolvimento de estudos detalhados que avaliem o modo de ação e os meios de prevenção do incremento de mutações, devido a causas antrópicas. Segundo Ribeiro et al. (2003), estudos sobre o comprometimento ambiental, decorrente de contaminação por agentes genotóxicos, merecem uma atenção bastante especial por parte da comunidade científica, pois podem servir de alerta para os perigos que as populações possam estar expostas.

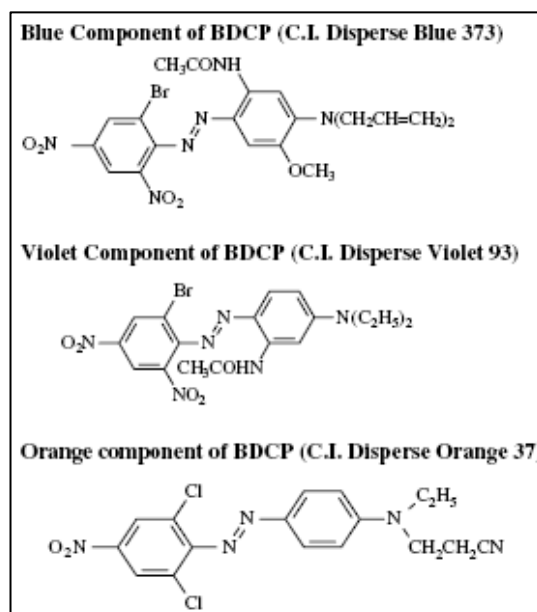
A interação entre diferentes métodos de avaliação de potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico fornece uma visão mais abrangente sobre o efeito de um determinado agente químico. Estudos que avaliam a toxicidade dos azocorantes e de metabólitos relacionados com a sua degradação são importantes para o estabelecimento de estratégias de redução dos efeitos perigosos destes químicos (ANGELIS et al., 1982; MOAWAD et al., 2003; OLIVEIRA, 2005). Os estudos de biodegradação destes corantes e a descoberta de microorganismos capazes de degradá-los de maneira eficiente, também contribuem na minimização dos danos que esses compostos químicos possam proporcionar aos organismos e ao meio ambiente (DE ANGELIS et al., 1982; KUNZ et al., 2002).

A espécie *Allium cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade (MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008), devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1978; GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO et al., 2006). Os ensaios de aberrações cromossômicas, os bandamentos cromossômicos, e a hibridação *in situ* são importantes ferramentas que auxiliam na detecção de mutações em sistemas expostos a substâncias químicas (MALUSZYNSKA; HESLAP-HARRISON, 1993; RANK et al., 2002; KIM et al., 2002).

Há poucos relatos na literatura sobre os efeitos adversos do corante comercial BDCP e, portanto, pesquisas adicionais são necessárias para avaliar os efeitos tóxicos desse produto. O uso de diferentes organismos-testes pode aumentar as informações sobre o referido corante. Dessa maneira, esse estudo se caracteriza como inovador, uma vez que avaliou a

citotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade do corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product, no organismo-teste *A. cepa*, antes e após processos de biorremediação, com 3 diferentes microorganismos (bactéria, levedura e fungo).

O BDCP é composto por três corantes pertencentes ao grupo dos nitro-aminoazobenzenos: C.I. Disperse Blue 373 ( $C_{21}H_{21}BrN_6O_6$ ; CAS nº 51868-46-3), C.I. Disperse Violet 93 ( $C_{18}H_{19}BrN_6O_5$ ; CAS nº 268221-71-2) e C.I. Disperse Orange 37 ( $C_{17}H_{15}Cl_2N_5O_2$ ; CAS nº 13301-61-6) (UMBUZEIRO et al., 2005), e sua estrutura molecular é mostrada na Figura abaixo:



Para melhor apresentação desta tese, os materiais utilizados, as metodologias, os resultados e as discussões de cada tema específico abordado, foram organizados em 4 artigos científicos. Após a apresentação dos referidos artigos, foram realizadas, ainda, as considerações finais de todos os dados apresentados, a fim de correlacioná-los, fornecendo, assim, uma visão mais holística dos efeitos do corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product) sobre o organismo-teste *A. cepa*.

#### **4. OBJETIVOS**

Pelo amplo uso dos azocorantes nas indústrias têxteis, o presente trabalho teve como objetivo verificar a citotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade do corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), antes e após tratamento microbiano, usando *A. cepa* como organismo-teste.



#### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- avaliar o potencial citotóxico do BDCP, pela análise de alterações nos índices mitóticos e pela presença de processos de morte, das células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das radículas em diferentes concentrações do BDCP, antes e após períodos de recuperação e tratamentos de biodegradação;

- avaliar os potenciais genotóxico e mutagênico do BDCP, por meio de ensaios de aberrações cromossômicas, em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial BDCP, antes e após períodos de recuperação e tratamentos de biodegradação;

- verificar e analisar, detalhadamente, determinadas alterações celulares e sítios cromossômicos mais susceptíveis das células meristemáticas de *A. cepa* à ação do BDCP, por meio dos ensaios de bandamentos cromossômicos (bandamento C, bandamento RON e bandamento por fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub>/DAPI) e pela técnica de FISH (Hibridação *in situ* fluorescente);

- analisar a variação do número de nucléolos das células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do BDCP, pelo bandamento RON, antes e após períodos de recuperação e tratamentos de biodegradação;

- analisar a frequência de micronúcleos em células F<sub>1</sub> (região não meristemática) de raízes de *A. cepa*, expostas a diferentes concentrações do corante comercial BDCP, antes e após períodos de recuperação e tratamentos de biodegradação;

- identificar, analisar e quantificar os diferentes tipos de aberrações cromossômicas induzidas pelo BDCP, sob o sistema-teste de *A. cepa*, antes e após tratamentos de biodegradação;

- inferir os possíveis mecanismos de ação do BDCP sob células de meristemas radiculares de *A. cepa*;

- verificar e comparar as vantagens e desvantagens do uso de três diferentes espécies de microorganismos – bactérias (“pool” de bactérias heterotróficas provenientes de uma estação de tratamento biológico de efluentes), leveduras (*Candida viswanathii*) e fungos (*Phanerochaete chrysosporium*) – para degradar o corante comercial BDCP, usando diferentes técnicas citogenéticas sobre o organismo teste *A. cepa*;

- contribuir com informações sobre os potenciais efeitos danosos do azocorante comercial BDCP sobre o meio ambiente e sobre organismos vegetais a eles expostos;
- oferecer importantes informações sobre a indicação de uso de processos de biorremediação no tratamento de águas contaminadas com azocorantes.

## **5. REVISÃO DA LITERATURA**

A utilização de corantes é uma prática bastante antiga, devido à sua importância na coloração de diferentes substratos, como tecido, papel, couro, entre outros (KAMMRADT, 2004; OLIVEIRA, 2005). Antes da metade do século XIX, os corantes eram extraídos de fontes naturais, principalmente de animais ou vegetais. No entanto, os corantes naturais foram quase que completamente trocados pelos sintéticos no início do século XX. Hoje, praticamente, todos os corantes e pigmentos comerciais disponíveis são substâncias sintéticas, com exceção de alguns pigmentos inorgânicos importantes. Todos os anos, centenas de novos compostos coloridos são lançados no mercado e indicados para uma série de diferentes aplicações (MAJCEN-LE MARECHAL et al., 1997).

Os corantes e os vários compostos orgânicos usados para tingimento são substâncias químicas já incorporadas pela tecnologia do nosso cotidiano. O consumo mundial de corantes e pigmentos é de, aproximadamente,  $7 \times 10^5$  toneladas/ano, sendo que, só na indústria têxtil, consome-se cerca de dois terços de toda a produção mundial (NIGAM et al., 1996). No Brasil, são consumidas 26.500 toneladas de corantes todos os anos, que corresponde a 3,8% de todo corante produzido no mundo (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Durante o processo têxtil, ineficiências da coloração geram uma grande quantidade de resíduos de corantes, que são diretamente lançados nos corpos d'água e que, conseqüentemente, contaminam o meio ambiente. Nos processos de tingimento, indústrias despejam quantidades enormes de poluentes nos corpos aquáticos, decorrentes das impurezas da remoção da matéria bruta e dos reagentes químicos residuais usados em tais processos

(CORREIA et al., 1994). Os resíduos dos corantes são descarregados em águas que passam pelos sistemas de tratamento das empresas ou são lançados, diretamente, no ambiente, causando uma contaminação severa dos corpos d'água, fato principalmente observado próximo às áreas com alta concentração de indústrias têxteis (CHUDGAR, 1985; STOLZ, 2001; KUNZ et al. 2002).

Dentre os resíduos de corantes que poluem o ambiente, estão os azocorantes que são lançados em grandes quantidades, diretamente nos corpos d'água, caracterizando uma importante via de contaminação ambiental (O'NEILL et al.; 1999; MCMULLAN et al., 2001; PEARCE et al., 2003). Segundo Nam e Renganathan (2000) e Jarosz-Wilkolazka et al. (2002), cerca de 10 a 15% do total de corante utilizado pelas indústrias é perdido durante o processo de tingimento e, assim, liberado para o ambiente. De acordo com O'Neill et al. (1999), esses valores podem ser ainda mais altos, com variação de 2 a 50%. Contudo, dados exatos da quantidade de corantes liberados no meio ambiente ainda não são totalmente conhecidos (EKICI et al., 2001). No Brasil, a indústria têxtil é responsável pela geração de grandes volumes de resíduos, com elevada carga orgânica e forte coloração, o que representa um grande problema ambiental gerado pelo setor têxtil.

Segundo Kirk-Othmer (1979), os corantes podem ser classificados em:

- **corantes ácidos**: corantes aniônicos, solúveis em água, com um ou mais grupos ácidos sulfônicos ou carboxílicos em suas moléculas e, quimicamente constituídos de compostos azo, antraquinonas e triarilmetanos, iminocetona, nitro, nitroso e quinolina, com aplicação em nylon, seda, acrílicos modificados, lã, papel, alimentos e cosméticos;
- **corantes básicos**: corantes catiônicos, solúveis em água, produtores de compostos catiônicos coloridos em solução e quimicamente constituídos de compostos azo, antraquinona, triarilmetano, metano, tiazina, oxazina, acridina e quinolina, com aplicação em acrílicos modificados, nylons modificados, poliésteres modificados e papéis, além de alguns deles terem atividade biológica e serem usados na medicina como anti-sépticos;
- **corantes diretos**: compostos aniônicos, solúveis em água, quando na presença de eletrólitos (sais que aumentam sua afinidade pela fibra). Quimicamente, são constituídos de compostos azo, com tiazóis, ftalocianinas e oxazinas, com aplicação no tingimento de algodão e celulose regenerada, papel, couro e nylon;
- **corantes fluorescentes (grupo dos xantenos)**: compostos sem cor, que absorvem luz ultravioleta incidente e reemitem na região visível (azul) do espectro. Na verdade, não são

corantes, mas devido a sua ampla aplicação em tecidos e outros materiais, o *Colour Index* fez sua classificação dentro deste grupo de químicos;

- **corantes reativos**: compostos de estrutura química muito simples, com espectro de absorção apresentando estreita faixa de captação e tingimento possuindo características brilhantes. Quimicamente, são constituídos de compostos azo, antraquinona e ftalocianinas, com grande propriedade de fixação por métodos simples de tingimento, fazendo ponte covalente com a fibra (algodão, lã ou nylon), por meio do grupo compatível hidroxila da celulose;

- **corantes sulfurosos**: grupo pequeno de corantes, contudo, com baixo custo e boas propriedades de fixação. São aplicados em algodão, após banho de redução alcalina, com sulfito de sódio como agente redutor;

- **corantes vat**: compostos insolúveis em água e aplicados, principalmente, em fibras celulósicas, como sais leuco-solúveis, após redução em banho alcalino, normalmente com hidrossulfito de sódio. Após a exaustão da fibra, são re-oxidados para a forma ceto-insolúvel e, após tratamento, normalmente por soda, desenvolve estrutura cristalina. Quimicamente, são as antraquinonas e os índigos;

- **precursores de corantes**: corantes obtidos de materiais crus. Este grupo tem característica química simples, tais como benzeno e naftaleno, cuja cor é dada por uma variedade de reações químicas. Normalmente são compostos aromáticos cíclicos e derivados, principalmente, de petróleo e carvão.

De acordo com Guaratini e Zanoni (2000), ainda existem os **corantes dispersivos**, que são produtos insolúveis em água, aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas, por meio de suspensão. Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a formação originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa sobre o acetato de celulose. Usualmente, o processo ocorre na presença de agentes dispersantes de cadeias longas, que estabilizam a suspensão do corante, facilitando o contato com a fibra hidrofóbica. Esta classe de corantes é constituída, principalmente, por azocorantes e tem sido utilizada para tingimento de fibras sintéticas, tais como acetato de celulose, nylon, poliéster e poliamida.

Atualmente, há mais de 3000 diferentes corantes disponíveis no mercado, sendo que metade deles pertence à classe de compostos azocorantes (MAJCEN-LE MARECHAL et al., 1997). Estes corantes são utilizados nas indústrias têxteis, para a coloração de poliéster, nylon, diacetato e triacetato de celulose e de fibras acrílicas (CHUNG; STEVENS, 1993; KROSCWITZ; HOWE, 1993; KUNZ et al., 2002; RAFII et al., 1997), sendo também

utilizados como aditivos de produtos derivados de petróleo e no tingimento de couros, tintas, plásticos, papéis, madeira, óleos, cosméticos, medicamentos, metais e alimentos (GORDON; GREGORY, 1983; ZOLLINGER, 1987; USEPA, 1994; RAFII et al., 1997; EDWARDS, 2000; STOLZ, 2001). Além de sua versatilidade, pela diversidade de suas aplicações, há muitas outras vantagens da utilização de azocorantes nas indústrias. Esses compostos químicos são facilmente sintetizados, possuem excelentes propriedades de fixação e permanência, e apresentam uma grande variedade nas cores, quando comparados aos corantes naturais (GRIFFITHS, 1984; USEPA, 1994).

Os azocorantes são compostos caracterizados pela presença de um ou mais grupos azo (-N=N-), geralmente em número de um a quatro, ligando radicais fenil e naftil, que são, usualmente, substituídos com algumas combinações de grupos funcionais incluindo: amino (-NH<sub>2</sub>), cloro (-Cl), hidróxi (-OH), metil (-CH<sub>3</sub>), nitro (-NO<sub>2</sub>), ácido sulfônico e sais de sódio (-SO<sub>3</sub>Na) (SHAUL et al., 1986). Os azocorantes, sintetizados a partir de compostos aromáticos, não são básicos em solução aquosa (devido à presença da ligação N=N, que reduz a disponibilidade de pares desemparelhados de elétrons nos átomos de nitrogênio), são prontamente reduzidos a hidrazinas e a aminas primárias, funcionando como bons agentes oxidantes (USEPA, 2008).

Se por um lado o numeroso grupo dos azocorantes atende às necessidades do homem, por outro, acarreta mudanças ecológicas e sanitárias nos recursos hídricos, no solo e na atmosfera (ANGELIS, 1982). A presença de corantes nos corpos aquáticos leva a um problema estético e pode ter um impacto negativo à saúde pública (CHUNG, 1983; ACHWAL, 1997). Porém, muitos efluentes líquidos e sólidos das indústrias têxteis são tratados antes de serem liberados ao meio ambiente, o que reduz o impacto por estes agentes sobre o ambiente aquático.

Apesar da dificuldade do tratamento dos resíduos gerados e das indicações contrárias ao seu uso, os corantes, especialmente os sulfurosos, são muito utilizados para o tingimento de fibras. Isto se deve, principalmente, ao seu custo acessível e às suas boas características de fixação (BURKINSHAW, 1996).

Muitos países adotaram legislação ambiental e requerimentos restringindo o uso de químicos perigosos na produção de têxteis e vestuário, sendo que uma das leis mais conhecidas nesse assunto é a Segunda Emenda ao Ato de Proteção do Consumidor, elaborada pelo governo alemão em 1994, proibindo a utilização de azocorantes. De acordo com a

legislação alemã, alguns azocorantes são considerados alergênicos (Disperse Yellow 1/3; Disperse Orange 3/37/76; Disperse Red 1; Disperse Blue 1/35/106/124) e alguns são considerados cancerígenos (Acid Red 26, Basic Red 9, Basic Violet 14, Direct Black 38, Direct Red 28, Direct Blue 6, Disperse Yellow 3, Disperse Orange 11, Disperse Blue 1) (POLICY RESEARCH CENTER FOR ENVIRONMENT AND ECONOMY, 1999). Além disso, outros países europeus, tais como a Suécia, a França e a Dinamarca, formularam legislação própria para os azocorantes (POLICY RESEARCH CENTER FOR ENVIRONMENT AND ECONOMY, 1999). O governo português, por exemplo, publicou o Decreto-Lei nº 208/2003 (DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA, DE 15 DE SETEMBRO DE 2003), que reza: Azocorantes que, por clivagem redutora de um ou mais grupos azóicos, possam liberar uma ou mais aminas aromáticas em concentrações detectáveis, isto é, superiores a 30 ppm, não podem ser utilizados em artigos têxteis e de couro susceptíveis a entrarem em contato direto e prolongado com a pele humana ou com a cavidade oral.

Considerando-se que os azocorantes, após clivagem, apresentam capacidade de liberar aminas aromáticas consideradas carcinogênicas, a União Européia, por meio da Diretriz 2002/61/EC, reformulada pela Diretriz 2004/21/CE, banuiu o uso desses corantes utilizados na produção de artigos têxteis que entrem em contato com a pele ou com a boca. Essas Diretrizes estabelecem, ainda, que os referidos artigos têxteis não podem conter as 22 aminas listadas na legislação, numa concentração acima dos 30 ppm e, se os artigos forem feitos de fibras recicladas, não podem conter mais do que 70 ppm (POLICY RESEARCH CENTER FOR ENVIRONMENT AND ECONOMY, 1999; ETAD, 2007).

De acordo com Umbuzeiro et al. (2005), o corante comercial preto (BDCP - Black Dye Commercial Product), muito utilizado na indústria de tingimento, é composto por 3 corantes pertencentes ao grupo dos nitro-aminoazobenzenos: C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 e C.I. Disperse Orange 37. De acordo com Guaratini e Zanoni (2000), Oliveira (2005) e USEPA (1996), o BDCP é um composto orgânico pertencente à classe dos corantes dispersivos com função azóica, que possui, no mínimo, uma ligação azo, além de apresentar insolubilidade em água e boa fixação a fibras naturais e sintéticas. Ainda segundo Guaratini e Zanoni (2000), no processo de tingimento de fibras com azocorantes, há impregnação da fibra com um composto solúvel em água (agente de acoplamento), que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio ( $\text{RN}_2^+$ ) provoca uma

reação com o agente de acoplamento já fixado à fibra, produzindo um corante insolúvel em água. Dessa maneira, o corante é formado diretamente sobre a fibra, permitindo que este processo forneça bons resultados, como alto padrão de fixação e alta resistência à luz e à umidade. Pelo fato destes compostos serem insolúveis em água, agentes dispersantes são adicionados ao corante, produzindo partículas finamente divididas. Essa mistura resulta em uma dispersão estável no banho de tintura.

## **1. TRATAMENTOS DE EFLUENTES TÊXTEIS**

Os ambientes aquáticos são de extrema importância para a população mundial, pois são usados como fonte de obtenção de água, para o cultivo agrícola e para a produção animal, além de estarem também associados às atividades recreativas. Rios, lagos e oceanos acabam sendo o destino final de uma enorme quantidade de poluentes, derivados de atividades industriais, agrícolas e domésticas, o que coloca em risco toda a população associada aos recursos hídricos (OHE et al., 2004).

As indústrias de corantes e as indústrias têxteis são, respectivamente, as maiores produtoras e usuárias de azocorantes, produzindo toneladas de resíduos, que acabam sendo lançados no meio ambiente e causando sérios problemas, devido a sua estabilidade química e fotolítica, o que decorre em sua alta persistência nos ambientes naturais (TRINDADE et al., 1986; HOLME, 1984; HAO et al., 2000). A instalação de tratamento de efluentes eficientes nas indústrias têxteis que fazem uso de azocorantes é uma preocupação crescente, devido ao visível impacto estético causado pelo lançamento de resíduos que atinge os corpos d'água, bem como os possíveis efeitos tóxicos que estes compostos possam promover sobre a biota associada a estes recursos hídricos. À medida que a legislação ambiental se torna mais exigente, a efetividade e a redução do custo dos processos de tratamento se tornam mais importantes (KAMMRADT, 2004).

A contaminação ambiental decorrente da emissão de efluentes de indústrias de tingimento é um problema mundial (KUNZ et al., 2002), por isso diferentes métodos de tratamento de efluentes têm sido utilizados na tentativa de minimizar os problemas decorrentes dessa contaminação (OLIVEIRA, 2005). De acordo com Robinson et al. (2001), os corantes têxteis podem ser removidos, fisicamente, pelos processos de floculação, adsorção, carvão ativado, cavacos de madeira, sílica gel, filtração por membranas, troca



iônica, radiação UV, coagulação eletrocinética e filtração, ou quimicamente por processos de oxidação, por peroxidação de sais de ferro II (reação Fenton), pela ozonização, por processos fotoquímicos de destruição eletroquímica, pelo sistema UV-peróxido, pelo cucurbituril e por meio do hipoclorito de sódio. No entanto, a maioria desses métodos, que simplesmente acumula ou concentra os corantes (ROBINSON et al., 2001), apresenta alto custo e origina uma poluição secundária, causada pelo uso excessivo de substâncias químicas (JADHAV et al., 2007). Em contrapartida, a biorremediação, ou seja, a degradação biológica desses corantes tem merecido destaque, por não apresentar tais problemas. Porém, para que a biorremediação constitua um tratamento eficiente, é necessário levar em consideração quais são as enzimas aptas em degradar determinados azocorantes (BANAT et al., 1996; ÖZTÜRK; ABDULLAH, 2006; JADHAV et al., 2007), pois estes são compostos sintéticos, relativamente resistentes aos processos de degradação biológica, devido à sua complexa estrutura química (HOLME, 1984; KIM; SHODA, 1999). Também devem ser realizados testes que avaliem os efeitos tóxicos ou inibitórios desses poluentes, sob a população microbiana (JEWORSKI; HEINZLE, 2000). Pelo fato da maioria dos corantes sintéticos ser recalcitrante à degradação microbiana, os efluentes das indústrias têxteis são, normalmente, resistentes ao tratamento biológico, tanto com microorganismos como com plantas (FERREIRA, 1998; MARTINS et al., 2001, 2002, 2003).

Mcmullan et al. (2001) afirmam que a habilidade dos microorganismos descolorirem e metabolizarem corantes é, há muito tempo, conhecida e o uso de tecnologias baseadas em biorremediação, para o tratamento de efluente têxtil, tem despertado grande interesse. Pesquisas realizadas na última década aumentaram o número de microorganismos reconhecidamente hábeis em descolorir e degradar corantes artificiais (KEHARIA; MADAMWAR, 2003).

Os azocorantes são compostos orgânicos dificilmente biodegradáveis, devido à sua alta estabilidade à luz e à sua resistência ao ataque microbiano. Estes corantes são resistentes à biodegradação convencional (PAGGA; BROWN, 1986; SHAUL et al., 1991), mas, sob condições anaeróbicas, têm sido associados à geração de metabólitos. No estágio inicial da degradação anaeróbica dos azocorantes, uma clivagem redutiva de ligações azo começa a ocorrer, originando aminas aromáticas, que são recalcitrantes para as bactérias anaeróbicas (ZAOYAN et al., 1992; WEBER; ADAMS, 1995), com exceção das poucas aminas aromáticas substituídas por grupos hidroxil e carbo-hidroxil, as quais são degradadas sob

condições metanogênicas (RAZO-FLORES et al., 1996). Por outro lado, as amins aromáticas são prontamente degradadas, aerobicamente (BROWN; LABOUREUR, 1983; LOIDL et al., 1990).

Embora os azocorantes representem uma classe potencialmente importante de poluentes orgânicos, pouco se sabe sobre o seu destino (CHIVUKULA; RENGANATHANM 1995). Há cerca de 30 anos, muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de utilizar microorganismos como agentes de biorremediação no tratamento de corpos aquáticos contendo corantes têxteis (PARK; SHORE, 1984). Os métodos biológicos utilizados nos tratamentos de efluentes que contêm corantes utilizam diferentes organismos (OLIVEIRA, 2005), sendo que alguns microorganismos têm recebido grande atenção, quanto a sua capacidade e habilidade no processo de descoloração de efluentes de indústrias têxteis (BANAT et al., 1996). A descoloração de corantes por microorganismos é comumente realizada com bactérias ou fungos Basidiomicetos. No entanto, existem outros organismos capazes de degradar azocorantes, tais como algumas algas do gênero *Chlorella* (JINKI; HOUTIAN, 1992; ACUNER; DILEK, 2004), *Oscillatoria* (JINKI; HOUTIAN, 1992) e *Spirogyra* (MOHAN et al., 2002) e algumas plantas, como *Rheum rubarbarum* (AUBERT; SCHWITZGÜEBEL, 2004) e plantas típicas de ambientes alagados (MBULIGWE, 2005).

Em função da diversidade, concentração e composição dos corantes presentes nos efluentes, existe uma grande motivação dos pesquisadores em estudar a biodegradação de compostos perigosos e também em descobrir microorganismos capazes de degradar, de maneira eficiente, um grande número de poluentes a um baixo custo operacional (KUNZ et al., 2002).

### **1.1. Biodegradação de azocorantes por bactérias**

O grupo das bactérias tem sido utilizado na degradação de corantes, sendo consideradas, particularmente, úteis para a degradação de azocorantes, pois possuem a capacidade de realizar a clivagem reductiva das ligações azo, presentes neste tipo de composto (KUNZ et al., 2002).

A metabolização de azocorantes por bactérias, sob condições anaeróbicas, pode ocorrer por diferentes maneiras: 1. clivagem da ligação azo, catalisada por azoredutases (enzimas citoplasmáticas com baixa especificidade ao substrato) (ROBINSON et al., 2001;

STOLZ, 2001); 2. por redução não específica por transportadores de elétrons (reações redox), a partir de vias metabólicas celulares (ex: liberação de flavinas, quinonas, hidroquinonas) (KECK et al., 1997; PINHEIRO et al., 2004; YOO, 2002); 3. ação de compostos inorgânicos reduzidos, como o  $Fe^{2+}$ , que são formados como produto final de certas reações metabólicas de bactérias estritamente anaeróbicas (STOLZ, 2001; VAN DER ZEE et al., 2001; YOO, 2002; VAN DER ZEE et al., 2003); 4. redução química por radicais sulfil, gerados na redução de sais de sulfato (PINHEIRO et al., 2004; YOO, 2002).

Segundo Brown e Hamburger (1987), a mineralização total das aminas aromáticas não coloridas, formadas a partir da degradação bacteriana de azocorantes, não é possível sob condições anaeróbicas e, dessa maneira, estas aminas se acumulam no meio ambiente, podendo ter ações tóxicas, mutagênicas e, possivelmente, carcinogênicas para animais expostos (KAMMRADT, 2004). É importante considerar que o tratamento bacteriano, em condições aeróbicas, geralmente é eficiente para mineralizar, totalmente, essas aminas aromáticas (ANDREAS et al., 1997; ISIK; SPONZA, 2003).

No Estado de São Paulo, a maioria das indústrias de processamento de corantes utiliza, principalmente, sistemas de lodo ativado para o tratamento de seus efluentes. Porém, alguns estudos demonstraram que os sistemas de lodo ativado não são eficientes para a remoção de todos os corantes e aminas aromáticas presentes em efluentes industriais. Pelos estudos de Van Der Zee et al. (2001), foi observado que a aplicação de lodo ativado em câmara de fluxo laminar ascendente, em condições anaeróbicas, de 20 tipos de azocorantes, causou reduções significativas da coloração em apenas 8 deles. Shal et al. (1991), estudando 18 tipos de azocorantes, observaram que 11 deles não foram alterados pelo tratamento de lodo ativado, 4 (Acid Blue 113, Acid Red 151, Direct Violet 9 e Direct Violet 28) foram adsorvidos ao lodo ativado (composto com diferentes espécies de bactérias) e apenas 3 (Acid Orange 7, Acid Orange 8 e Acid Red 88) foram biodegradados. Estudos realizados pela USEPA (1989) demonstraram que 20% do corante C.I. Disperse Blue 79 permaneceu no efluente final, após tratamento com lodos ativados. A detecção e a quantificação dos componentes do corante comercial preto (BDCP – Black Dye Commercial Product), presentes nas amostras de efluentes brutos e tratados do Ribeirão dos Cristais, mostraram que esse produto comercial é recalcitrante, até mesmo ao tratamento aeróbico (OLIVEIRA et al., 2007).

A habilidade bacteriana para biodegradar azocorantes tem sido relatada para muitas espécies, como: *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Shigella* sp.,

*Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*; *Pseudomonas luteola* e *Mycobacterium avium* (HU, 1998; CHEN et al., 1999; ORANUSI; OGUGBUE, 2001; JONES et al., 2003). Estudos realizados por Wong e Yuen (1996) mostraram que a bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi eficiente na degradação de um azocorante, o methyl red, inferindo que ela poderia ser usada no tratamento de efluentes industriais contendo outros azocorantes. Zissi e Lyberatos (2000) demonstraram que a bactéria *Bacillus subtilis* foi capaz de degradar azocorantes presentes em efluentes de indústrias têxteis. Estudos realizados por Paszczynski et al. (1991), Zhou e Zimmerman (1993), Cao et al. (1993), McMullan et al. (2001), Bhaskar et al. (2003) mostraram que certas bactérias do gênero *Streptomyces*, conhecidas por produzir peroxidases extracelulares que atuam na degradação de lignina, foram eficazes na degradação de corantes. Porém, em condições de aerobiose, os azocorantes mostram-se mais resistentes ao ataque bacteriano (HU, 1998).

## **1.2. Biodegradação de azocorantes por leveduras**

De acordo com Kwasniewska (1985) e Kakuta et al. (1998), algumas leveduras são capazes de degradar corantes sintéticos. Estudos realizados por Martins et al. (1999) e Ramalho et al. (2002, 2004 e 2005) mostraram que algumas espécies de leveduras, como *Candida zeylanoides*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia occidentalis*, possuem habilidade para clivar a ligação azo de azocorantes, originando aminas aromáticas, por mecanismos de redução, semelhantes aos de muitas bactérias. Vitor (2005) demonstrou que a levedura *Candida albicans* possui habilidade de degradar um azocorantes, o “Direct Violet 51”, comprovando que os sítios mais vulneráveis de rompimento desse composto são as ligações de nitrogênio nas aminas secundárias. Segundo Meehan et al. (2000), a remoção da cor do Remazol Black-B pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ocorreu devido à adsorção química desse azocorante pela biomassa celular e não devido a quaisquer atividades químicas enzimáticas. Estudos realizados por Jadhav et al. (2007) demonstraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* degradou, eficientemente, o azocorante methyl red, considerado tóxico, podendo ser usada nos processos de biodegradação de corantes presentes no meio ambiente.

De acordo com Ramalho (2005), leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, são bons agentes de biorremediação de azocorantes, uma vez que seu crescimento e

sua viabilidade não são afetados pela presença de corantes e de seus metabólitos (potencialmente carcinogênicos e mutagênicos), além de serem organismos capazes de realizar a completa mineralização de compostos azo. Segundo Jadhav e Govindwar (2006), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* representa, além de um material biológico de baixo custo, um organismo promissor para a remoção de um azocorante tóxico, o methyl red, encontrado em efluentes procedentes de indústrias de tingimento, já que foi capaz de degradar rápido e totalmente o referido corante.

### **1.3. Biodegradação de azocorantes por fungos**

Kunz (1999) confirma que estudos envolvendo a biodegradação de efluentes tóxicos têm aumentado nos últimos anos, sendo que há um grande destaque para a classe de fungos Basidiomicetos. Estes fungos são utilizados na indústria alimentícia, na produção de enzimas, no tratamento de efluentes e em outras atividades.

Os processos de degradação de corantes por fungos Basidiomicetos, principalmente os fungos da podridão branca, que são os microorganismos com grande habilidade de biodegradação de corantes, estão ligados à ação de exoenzimas que agem na lignina (polímero estrutural encontrado na parede celular de plantas), como as lacases, as lignina peroxidases (LiP), as peroxidases dependentes de manganês (MnP) (CHIVUKULA et al., 1995; FU; VIRARAGHAVAN, 2001; HEINFLING et al., 1998; KIM; SHODA, 1999; SCHLIEPHAKE et al., 2000), bem como enzimas produtoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GOLD et al., 1988; KIRBY et al., 2000; KUNZ et al., 2002; ROBINSON et al., 2001), que têm habilidade para degradar muitos poluentes recalcitrantes, inclusive corantes sintéticos (SWAMY; RAMSAY, 1999; SELVAM et al., 2003).

Entre os fungos da podridão branca que têm a capacidade de degradar dioxinas, bifenilas policloradas (PCBs), outros compostos orgânicos clorados e azocorantes, capacidade esta relacionada, diretamente, com a natureza dos grupos substituintes dos anéis aromáticos, podemos citar o *Phanerochaete chrysosporium* (KIRBY et al., 2000; CRIPPS et al., 1990; GOSZCZYNSKI et al., 1994; SPADARO et al., 1992; WESENBERG et al., 2003, GLENN; GOLD, 1983, BUMPUS; BROCK, 1988, PASTI-GRIGSBY et al., 1992; CHAO; LEE, 1994; CONNEELY et al., 1999; CHAGAS; DURRANT, 2001; KUNZ et al., 2001; MARTINS et al., 2002; MIELGO et al., 2002), o *Trametes versicolor* (FIELD et al., 1992; BORCHERT;

LIBRA, 2001; TEKERE et al., 2001), o *Coriolus versicolor* (KAPDAN et al., 2000, KAPDAN; KARGI, 2002) e o *Bjerkandera adusta* (FIELD et al., 1992; HEINFLING-WEIDTMANN et al., 2001). Outros grupos de fungos que também têm se mostrado eficientes na descoloração de corantes, são: *Aspergillus niger* (ABD EL-RAHIM; MOAWAD, 2003), *Geotrichum candidum* (KIM et al., 1995; KIM; SHODA, 1999), *Pleurotus ostreatus* (MARTINS et al., 2003; PALMIERI et al., 2005; ZHAO et al., 2006) e *Cunninghamella elegans* (CHA et al., 2001; AMBRÓSIO; CAMPOS-TAKAKI, 2004), entre outros (FU; VIRARAGHAVAN, 2001).

Martins et al. (2001, 2002 e 2003) realizaram vários ensaios sobre a biodegradação dos azocorantes de aplicação têxtil pelo fungo filamentosso *Phanerochaete chrysosporium*, de modo a estudar até que ponto eles seriam recalcitrantes, e verificaram que as concentrações de nutrientes e dos azocorantes, bem como as estruturas dos corantes, interferem nos processos de biodegradação dos mesmos. Estudos realizados por Zhao et al. (2006) mostraram que os fungos da podridão branca degradam o azocorante Disperse Orange 3, originando aminas aromáticas, por um mecanismo oxidativo, que é diferente da via anaeróbica bacteriana. Kirby et al. (2000) demonstraram que o fungo *Phlebia tremellosa* foi capaz de degradar 8 corantes têxteis sintéticos presentes em efluentes artificiais, na concentração de 200 mg/L, reduzindo cerca de 96% de sua cor. Estudos realizados por Jesus (2005) mostraram a fragmentação de diferentes azocorantes, pela ação do fungo *Neurospora crassa*, originando, pelo menos, dois compostos amino, além de produzir anilina em grandes quantidades, o que explica o aumento da toxicidade dos azocorantes, após a degradação. Por estes estudos, os corantes “Procion Red MX-5B” e “Acid Red 151” foram considerados os mais tóxicos e os corantes “Direct Red 23” e “Erythrosine B”, os menos tóxicos.

## **2. TOXICIDADE DE AZOCORANTES**

Uma grande variedade de substâncias derivadas de corantes tem sido testada, em animais de laboratório, para determinar os reais efeitos tóxicos destes compostos sobre os organismos vivos (HOLME, 1984). Estudos que avaliam a toxicidade dos azocorantes e de metabólitos relacionados com a sua degradação são importantes para o estabelecimento de estratégias de redução dos efeitos perigosos destes químicos (MOAWAD et al., 2003; OLIVEIRA, 2005).

A avaliação da toxicidade de corantes têxteis é muito importante, principalmente, pelos diferentes efeitos que causa ao meio ambiente e aos organismos a eles expostos. As atividades biológicas também diferem bastante entre os corantes e, apesar das similaridades das estruturas, as propriedades toxicológicas não podem ser generalizadas pela referência de somente um grupo químico (MAJCEN-LE MARCEBHAL et al., 1997).

O despejo descontrolado de azocorantes nos corpos d'água causa sérios problemas ambientais, tais como: a redução da absorção de luz pelos organismos que habitam os ambientes aquáticos e a produção de diferentes amins sob condições de anaerobiose (CHUNG; STEVENS, 1993; BANAT et al., 1996; SLOKAR; LEMARECHAL, 1998).

A toxicidade aguda dos azocorantes, medida pelos critérios da União Européia para a classificação de substâncias perigosas, é baixa, sendo os valores de LD<sub>50</sub> de 250-2000 mg/Kg de peso corpóreo (CLARKE; ANLIKER, 1980). Alguns corantes azobásicos, ácidos e diretos foram classificados como sendo muito tóxicos ou tóxicos para peixes, crustáceos, algas e bactérias, enquanto que os azocorantes reativos são tóxicos apenas em concentrações muito elevadas (níveis de Concentração Efetiva >100 mg/L), não sendo, assim, considerados tóxicos para organismos aquáticos (NOVOTNÝ et al., 2006).

Estudos revelaram a presença de alguns azocorantes em certas algas e plantas (SRIVASTAVA; PRAKASH, 1991) e têm mostrado efeitos adversos para populações microbianas aquáticas expostas a efluentes contendo corantes (MICHAELS; LEWIS, 1985).

Estudos têm revelado, ainda, a presença de azocorantes em diferentes amostras de água e sedimentos. Trabalhos realizados por Umbuzeiro et al. (2004), por meio do teste de Salmonella/Microsoma, mostraram uma atividade mutagênica baixa a moderada no Ribeirão dos Cristais (Cajamar/SP), devido à presença de azocorantes, compostos nitroaromáticos e amins aromáticas. Outro estudo realizado por Umbuzeiro et al. (2005) detectou a presença de corantes em todas as amostras coletadas (efluente da indústria de tingimento, água bruta e lodo da estação de tratamento de água), e associaram a mutagenicidade dessas amostras, principalmente da água bruta, à presença de corantes e de compostos policíclicos nitroaromáticos incolores, possivelmente gerados durante o tratamento do efluente. Oliveira (2005) demonstrou, ainda, a presença dos componentes do corante comercial preto (BDGP) e de amins aromáticas nos efluentes bruto e tratado, lançados por uma indústria de tingimento, indicando que o tratamento industrial não foi eficiente para a remoção destes compostos, corroborando alguns estudos realizados por Chung e Stevens (1993), Ekici et al. (2001) e Lise

(2002), que mostraram que sistemas de lodo ativado não são eficientes na remoção de azocorantes presentes em efluentes industriais.

Maguire e Tkacz (1991) detectaram 15 corantes diferentes em amostras de água, sólidos em suspensão e sedimentos de um rio do Canadá, sendo 3 dos corantes identificados como: C.I. Disperse Blue 79, C.I. Disperse Blue 26 e C.I. Disperse Red 60. Oliveira (2005) indicaram a presença de cerca de 1 µg de C.I. Disperse Blue 373 e 10 µg C.I. Disperse Orange 37, para cada 1 g de sedimento de duas amostras ambientais distintas (uma proveniente de um ponto localizado imediatamente abaixo da descarga do efluente de uma indústria têxtil e a outra proveniente de um ponto de coleta situado na entrada da estação de tratamento de água destinada ao abastecimento público), o que caracteriza altas taxas de atividade mutagênica para essas duas amostras. Esses mesmos corantes foram detectados em amostras de água da mesma área analisada por Umbuzeiro et al. (2005).

Muitos estudos indicam que a maioria dos azocorantes e seus subprodutos são tóxicos (HOLME, 1984) e/ou carcinogênicos (AMES et al., 1975; ANLIKER, 1979; CLARKE; ANLIKER, 1980; CHUNG et al., 1981) e podem causar diferentes danos aos organismos expostos (ANLIKER et al., 1988).

Alguns azocorantes apenas exibem atividade mutagênica quando a ligação azo é reduzida. As aminas aromáticas formadas podem ser mais ou menos carcinogênicas e/ou mutagênicas, em relação ao composto original, dependendo da sua estrutura química (UMBUZEIRO et al., 2005). De acordo com Plumb et al. (2001) e Yoo et al. (2001), essas aminas aromáticas são sempre mais perigosas que os compostos originais, podendo apresentar ações tóxicas (IDAKA et al., 1987; WONG; YUEN, 1996), mutagênicas e carcinogênicas (BELL et al., 2000). A redução desses azocorantes pode gerar adutos de DNA (LEVINE, 1991; STIBOROVA, 1992), o que pode levar a efeitos tóxicos, até mesmo para os microorganismos que atuam na descoloração de azocorantes (AKSU, 2005; BANAT et al., 1996; CHUNG, 1983; COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982; ZIMMERMANN et al., 1982).

A exposição oral de humanos a azocorantes pode levar à formação de aminas aromáticas, tanto por meio da microflora intestinal, como por azoredutases do fígado, sendo que algumas dessas aminas têm apresentado propriedades carcinogênicas (LIN; WU, 1973).

A toxicidade aguda de azocorantes, definida pelos critérios da União Européia para a classificação de substâncias perigosas, é muito baixa (OLLGAARD et al., 1998; VAN DER



ZEE, 2002), sendo apenas poucos deles com valores de LD<sub>50</sub> abaixo de 250 mg/kg da massa corpórea (VAN DER ZEE, 2002). No entanto, a sensibilidade ocupacional a azocorantes tem sido mostrada nas indústrias têxteis, desde 1930 (FOUSSEREAU et al., 1982), como, por exemplo, para alguns corantes dispersos (monoazo ou antraquinona) que se mostraram envolvidos com reações alérgicas (HATCH; MAIBACH, 1995).

Vários azocorantes apresentam atividade genotóxica e mutagênica em testes com microorganismos e células de mamíferos (VENTURINI; TAMARO, 1979; PRIVAL; MITCHELL, 1982; CLONFERO et al., 1990; FREEMAN et al., 1990; GARG et al., 2002). O 3-metoxi-4-aminobenzeno, por exemplo, é mutagênico para bactérias e carcinogênico para ratos, enquanto o 2-metoxi-4-aminobenzeno é fracamente mutagênico para bactérias e não carcinogênico para ratos (HASHIMOTO et al., 1977). Assim, a genotoxicidade e a mutagenicidade dos corantes está intimamente relacionada com a natureza e posição dos substituintes ligados ao grupo azo (UMBUZEIRO et al., 2005).

A exposição a alguns azocorantes tem sido relacionada ao desenvolvimento de câncer de bexiga, sarcomas esplênicos, hepatocarcinomas, anomalias celulares e aberrações cromossômicas (NONY et al., 1980; PATTERSON; BUTLER, 1982; PERCY et al., 1989; RAFII et al., 1997). Esses efeitos podem ser derivados da ação direta dos corantes sobre as células ou, principalmente, da formação de produtos do metabolismo, decorrentes da redução da ligação azo (CHUNG; STEVENS, 1993), que são capazes de reagir com a molécula de DNA, danificando-a (ARLT et al., 2002; BARTSCH, 1981; UMBUZEIRO et al., 2005).

Estudos realizados por Alves de Lima et al. (2007), por meio do teste de criptas aberrantes, mostraram que uma amostra de determinado efluente contendo compostos azóicos (C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 e C.I. Disperse Orange 37) do corante comercial preto (BDCP – Black Dye Commercial Product), induziu um aumento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos expostos às concentrações de 1% e 10% desse efluente.

De acordo com Biswas e Khuda-Bukhsh (2005), o azocorante *p*-dimethylaminobenzene (*p*-DAB) causou efeitos citotóxicos e genotóxicos, quando testado pela análise de aberrações cromossômicas, micronúcleos e índices mitóticos em células de medula óssea e em espermatozoides de ratos. A alimentação crônica dos ratos com *p*-DAB resultou em um aumento no número de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares em células germinativas, quando comparado com o grupo controle.

Al-Sabti (2000) observou efeitos mutagênicos para um azocorante têxtil, o “chlorotriazine reactive azo red 120”, pela indução de micronúcleos em eritrócitos de peixes. Wollin e Gorlitz (2004) e Rajaguru et al.(1999) concluíram, pelos estudos realizados com células de mamíferos, que alguns corantes têxteis induzem a formação de micronúcleos, por mecanismos de clastogenicidade.

Tsuboy et al. (2007) mostraram a genotoxicidade e a mutagenicidade do corante C.I. Disperse Blue 291, pela indução de fragmentação no DNA, formação de células portadoras de micronúcleos e pelo aumento no índice de apoptose em células de mamíferos (HepG2).

O trabalho de Caritá e Marin-Morales (2008), usando o organismo-teste *A. cepa*, mostraram a mutagenicidade de determinadas concentrações de efluentes industriais contaminados por azocorantes e outros compostos químicos, por induzir a formação de células portadoras de micronúcleos e de aberrações cromossômicas.

Matsuoka et al. (2001) demonstraram que os compostos PBTA1 e PBTA2 e seus respectivos azocorantes precursores são citotóxicos para células de hamster CHL e V79-MZ, induzindo a formação de células micronucleadas, núcleos multilobulados e intensamente condensados, e células binucleadas. O azocorante precursor do PBTA1 também induziu a endoreduplicação nas células V79-MZ de hamster. Provavelmente, estes compostos não afetam somente o DNA, mas também as proteínas estruturais e regulatórias envolvidas nos processos de divisão celular.

### **3. SISTEMA-TESTE VEGETAL**

Vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para avaliação de poluentes ambientais e são, atualmente, reconhecidos como indicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas. Além de sua sensibilidade para detecção de mutágenos em diferentes ambientes, a possibilidade da utilização de suas diferentes células e órgãos como biomarcadores genéticos, com capacidade de detectar desde mutações pontuais até as aberrações cromossômicas, tornam-nos organismos que se destacam para estudos de monitoramento ambiental (GRANT, 1994; YI; MENG, 2003).

De acordo com Ma et al. (1995), o uso de vegetais como organismos-teste tem sido indicado e validado por diversas agências ambientais, como o Programa Ambiental das

Nações Unidas (UNEP - United Nations Environmental Program), a Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – U.S. Environmental Protection Agency).

De acordo com Yi e Meng (2003), sistemas-testes de plantas podem detectar a genotoxicidade mais rápida e eficientemente do que ensaios animais, sendo mais simples e econômicos, podendo ser usados tanto para o controle da clastogenicidade como para monitoramento ambiental em geral. Meristemas radiculares de plantas constituem eficientes materiais testes para a detecção de clastogenicidade de poluentes ambientais, especialmente para o monitoramento, *in situ*, de contaminantes de água (MA et al., 1995).

Algumas espécies de vegetais superiores têm sido amplamente empregadas para avaliação da genotoxicidade de agentes químicos, devido às boas características de seus cromossomos, que permitem, além da investigação do potencial genotóxico, a avaliação dos mecanismos de ações dos agentes testados. Dentre os vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* constitui um dos organismos testes pioneiros nos estudos de indução de aberrações cromossômicas causadas pela ação de agentes físicos e químicos. O primeiro autor a utilizar essa espécie como sistema-teste foi Levan (1938) e, desde então, *A. cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e genotoxicidade, devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1978; GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO et al., 2006).

Para Grant (1982) e Chauhan (1999), *A. cepa* é um dos melhores sistemas-teste vegetais já estabelecidos, sendo rotineiramente utilizado para avaliar o potencial mutagênico de substâncias químicas presentes no ambiente, devido a sua alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-teste, principalmente com os mamíferos. Segundo Grant (1982), de 148 químicos, avaliados pelo teste de *Allium*, 76% apresentaram respostas positivas, o que levou o autor a sugerir a inclusão deste teste como rotineiro na triagem para determinação de danos cromossômicos induzidos por químicos. Fiskesjö (1985) relatou que a sensibilidade do teste de *A. cepa* foi muito semelhante à observada para os sistemas-teste de algas e de linfócitos humanos. Posteriormente, Rank e Nielsen (1994) mostraram uma correlação de 82% do teste de *A. cepa* em relação ao teste de carcinogenicidade em roedores.

Estes mesmos autores mostraram ainda que o teste de *A. cepa* também foi mais sensível que os testes de Ames e de *Microscreen*. Muitos trabalhos de comparação entre sistemas-teste vegetais vêm sendo realizados por diversos autores (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008, LEME; MARIN-MORALES, 2009), e a maioria tem mostrado uma maior sensibilidade de *A. cepa*, em relação a outras plantas superiores utilizadas como organismos-teste, como, por exemplo, a espécie *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGID et al., 2007).

A espécie *A. cepa* tem sido utilizada, com sucesso, na avaliação de químicos, puros ou em misturas complexas, como é o caso de grande parte das amostras ambientais (FISKESJÖ, 1985; RANK et al., 1993; MA et al., 1995). O teste em *A. cepa* tem sido eficiente na avaliação de inseticidas (BIANCHI, 2008; PEDRO, 2008), herbicidas (VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005; FERNANDES et al., 2007), metais pesados (MATSUMOTO et al., 2006), derivados de petróleo (LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008), corantes (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008), aditivos alimentares (TÜRKOĞLU, 2007) e outros agentes contaminantes de recursos hídricos (CHRISTOFOLETTI et al., 2007). Leme e Marin-Morales (2008) e Hoshina (2005) demonstraram a importância do *A. cepa* na avaliação do grau de contaminação de águas impactadas com derivados de petróleo; e Matsumoto e Marin-Morales (2004) e Caritá e Marin-Morales (2008), na investigação do potencial genotóxico e mutagênico de águas de rios que recebem efluentes industriais contaminados com cromo e azocorantes, respectivamente.

#### **4. TESTES DE CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE**

Vogel (1982) afirma que diferentes substâncias químicas podem causar mudanças prejudiciais herdáveis no material genético, sem que estas alterações sejam expressas de imediato.

A preocupação com a proliferação de agentes químicos introduzidos no ambiente, que levam a possíveis alterações genéticas nos organismos, foi um dos principais motivos que levou ao desenvolvimento de metodologias que avaliam a genotoxicidade de substâncias químicas (BRUSICK, 1987). Agentes genotóxicos são capazes de induzir instabilidade cromossômica, como, por exemplo, aberrações cromossômicas não causais, principalmente

deleções, translocações, ganho e perda de cromossomos inteiros, que podem contribuir para o desenvolvimento de processos celulares malignos (TSUTSUI et al., 1983, ROWLEY, 1984).

Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são, segundo Moraes (2000), indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental, como também para a identificação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes. A maioria dos testes para detectar substâncias mutagênicas baseia-se na análise de indução de danos cromossômicos como alterações estruturais, formação de micronúcleos, trocas entre cromátides-irmãs, avaliação de genes mutantes ou de danos no DNA, utilizando diferentes organismos como bactérias, insetos, plantas e vertebrados, tanto em teste *in vitro* como *in vivo* (PEÑA, 1996).

Segundo Thiriot-Quévieux (2002), a citogenética é uma área de conhecimento que possibilita a realização de inúmeros estudos. Os cromossomos podem ser estudados como uma manifestação morfológica do genoma, sendo possível a visualização microscópica de seus tamanhos, formas, números e comportamentos, durante a mitose e a meiose. Testes citogenéticos são adequados para identificar os efeitos perigosos de substâncias em suas diversas concentrações e em diferentes tempos de exposição, além de serem eficientes na avaliação da influência destas substâncias sobre os organismos (MORAES, 2000).

De acordo com Combes e Haveland-Smith (1982), alguns azocorantes têm induzido efeitos genotóxicos e carcinogênicos, identificados por meio de testes laboratoriais de curto e longo prazos.

#### **4.1. Ensaio de Aberrações Cromossômicas**

O ensaio de aberrações cromossômicas, um dos testes mais antigos e mais utilizados, tem sido considerado como um dos poucos métodos capazes de detectar mutações em sistemas expostos a substâncias químicas (RANK et al., 2002). Nos últimos 30 anos, o teste de Aberrações Cromossômicas (AC) tem sido largamente utilizado para o monitoramento ocupacional e ambiental, atuando como um biomarcador de efeitos genotóxicos induzidos por carcinógenos (HAGMAR et al., 2004). Desta maneira, este teste tem apresentado posição de destaque entre a bateria de testes recomendados por lei para avaliação de agentes genotóxicos (MATEUCA et al., 2006).

## **4.2. Bandamentos Cromossômicos**

Com o surgimento de técnicas diversificadas de coloração cromossômica foi possível aumentar as informações sobre a composição e a disposição de DNA de diferentes constituições ao longo dos cromossomos. Técnicas de bandeamentos cromossômicos, por exemplo, possibilitam uma análise mais detalhada da organização estrutural dos cromossomos do que as técnicas convencionais de coloração (ROWLAND, 1981; BERNINI, 1997; KIM et al., 2002; MUKAI et al., 1992; JIANG et al., 1993; TUNA et al., 2004).

### **4.2.1. Bandamento C**

De acordo com Brown (1996), existem dois tipos de heterocromatina: 1. constitutiva, que possui DNA altamente repetitivo, com poucos genes, permanecendo condensada durante todo o ciclo celular, com replicação mais lenta, em relação ao restante da cromatina, e presente em porções homólogas do par cromossômico, como centrômero e telômeros; 2. facultativa, formada pela heterocromatização de regiões eucromáticas, que está presente em apenas um dos homólogos e exibe estágios de condensação de acordo com o tipo celular, sendo geralmente distribuída ao longo de todo o comprimento cromossômico.

O bandamento C é uma técnica que permite localizar a heterocromatina, possibilitando a caracterização de cromossomos pela avaliação da quantidade e distribuição de bandas heterocromáticas dentro das eucromáticas (MARKS; SCHWEIZER, 1974).

Na técnica de Banda C, os cromossomos são expostos a uma solução básica (geralmente de hidróxido de bário) e, em seguida, a uma solução salina a temperatura elevada. Durante esse procedimento, o DNA é fragmentado e, progressivamente, eliminado do cromossomo. Aparentemente, a associação do DNA com as proteínas na heterocromatina é diferente e mais resistente às condições da técnica de bandamento C do que a associação DNA-proteína de eucromatina. Assim, quando é aplicada a técnica de bandamento C, há uma maior extração de DNA na eucromatina, levando a uma coloração menos evidente deste material, enquanto que a heterocromatina se caracteriza por porções constituídas de blocos de coloração mais intensa, denominados de bandas C (GUERRA, 1988).

Hsu (1975) atribui à heterocromatina uma função de proteção às porções eucromáticas. Para Yunis e Yasmineh (1971), Hatch et al. (1976), Bush et al. (1977) e Pathak

e Wurster-Hill (1977), a heterocromatina seria um material genético que facilitaria os eventos de especiação. Porém, para Hilliker e Appels (1980), as principais funções da heterocromatina são a caracterização da estrutura tridimensional do núcleo interfásico e o possível efeito direto ou indireto sobre a expressão gênica.

Análises de alterações naturais ou induzidas em células, primordialmente diplóides, também contribuem, amplamente, para o acervo das informações citogenéticas (THIRIOT-QUIÉVREUX, 2002). Estudos realizados por Kihlman (1966), Bourgeois (1974), Pathak et al. (1975), Reeves et al. (1974), Kaina (1977) e Gupta e Sharma (1981) mostraram, em diferentes organismos, uma localização preferencial de quebras cromossômicas induzidas por agentes alquilantes associadas à heterocromatina e a bandas definidas nos cromossomos. O mesmo foi citado para *Allium cepa*, onde a maioria das quebras ocorre em regiões teloméricas, que são heterocromáticas (NUTI RONCHI, 1986). A alta especificidade das quebras pode estar relacionada a uma maior afinidade de algumas zonas com agentes mutagênicos, seja pela presença de sítios frágeis ou pela composição de seqüências específicas do DNA, possivelmente, conectadas à matriz nuclear (NATARAJAN; RAPOSA, 1975).

#### **4.2.2. Bandamento RON**

Outra técnica que fornece subsídios ao estudo citogenético é a que localiza as regiões específicas de domínio nuclear, relacionadas ao nucléolo. A coloração pela prata é utilizada para visualizar, em microscopia de luz, as atividades do sítio de DNAr, visto que somente as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), funcionalmente ativas no ciclo celular anterior, são coradas pela prata (MILLER, 1976).

O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) tem afinidade por proteínas nucleares presentes nos nucleólos e por constrições secundárias de cromossomos que possuem genes de DNAr e que podem estar envolvidos na formação da região organizadora do nucléolo (RON). Com a utilização do nitrato de prata para o bandamento cromossômico, formam-se bandas em locais onde se encontram as proteínas nucleares. As marcações podem ser vistas na prófase ou até em cromossomos metafásicos, indicando uma transcrição dessas proteínas no último ciclo celular (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Desta forma, a coloração com o nitrato de prata

vem sendo utilizada para identificar o número de nucléolos e possíveis sítios ativos da RON em diferentes espécies (MURRAY et al., 1992; CARVALHO; GUERRA, 2002).

A posição das RONS auxilia na melhor compreensão dos eventos de alterações cromossômicas que se estabeleceram em cada cariótipo. De acordo com descrição de Guerra (1988), a técnica de bandeamento RON possibilita a observação detalhada das transformações que ocorrem em grupos de espécies próximas, com cariótipos muito semelhantes. Assim, em casos de indução de alterações cromossômicas por agentes genotóxicos, em regiões relacionadas aos sítios de DNAr, essa técnica poderá oferecer uma sensibilidade pontual, diagnosticando, facilmente, tais alterações. Com esta técnica também se pode avaliar a composição dos núcleos extranumerários, quanto à presença ou não de cromossomos portadores das RONS.

As RONS podem ser perdidas ou inativadas por fatores como: deleção ou translocação; supressão da região organizadora de nucléolo por competição funcional, devido a um balanço nucleolar causado pela interação de novas combinações gênicas estabelecidas em híbridos, processo este conhecido como anfiplastia (CERMEÑO et al. 1984).

#### **4.2.3. Bandamento por fluorocromos base-específicos**

A introdução de técnicas que utilizam corantes fluorescentes fornece subsídios para o estudo da organização e estrutura molecular da heterocromatina, por permitir o conhecimento da constituição dos pares de bases do material genético. Alguns fluorocromos têm afinidade por pares de bases específicas (AT ou CG), produzindo bandas fluorescentes de baixa ou de forte intensidade de regiões heterocromáticas, de acordo com a composição cromatídica dessas regiões e da reação das mesmas com o fluorocromo (VOSA, 1984; BERNINI, 1997). O 4'-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) é um fluorocromo AT-específico que interage com, pelo menos, 4 pares AT in tandem. A cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) é um fluorocromo CG-específico, que forma dímero em soluções aquosas que contenham íons de magnésio (KIM et al., 2002).

A técnica de coloração por CMA<sub>3</sub>, que aparentemente cora heterocromatina conectada às regiões ativa e inativa das RONS, pode facilitar muito o estudo do número e localização das RONS (AMEMYA; GOLD, 1986; PENDAS et al., 1993).



### **4.3. Hibridação *in situ***

Além das técnicas comumente usadas para se caracterizar a constituição cariotípica de espécies vegetais e animais, tais como metodologia de citogenética convencional, de bandamento C e de impregnação com nitrato de prata, a hibridação *in situ* vem se tornando importante ferramenta em estudos de caracterização cromossômica, uma vez que permite a localização de seqüências específicas do DNA em cromossomos metafásicos e no núcleo interfásico (MALUSZYNSKA; HESLAP-HARRISON, 1993).

A técnica de hibridação do DNA, usando imunofluorescência (FISH), foi, primeiramente, aplicada por Pinkel et al. (1986), para visualizar seqüências de DNA em células metafásicas e núcleos interfásicos humanos. Esta técnica tem sido, principalmente, usada no estudo de aberrações cromossômicas que não são detectadas pela coloração convencional, em estudos de citogenética do câncer e em mutagênese (HESLAP-HARRISON; SCHWARZACHER, 1996).

Dentre as diferentes seqüências de DNA repetitivo, usadas na técnica de hibridação *in situ*, a seqüência DNAr 45S (18S-5.8S-28S) é uma das mais empregadas, seguidas das DNAr 5S, microssatélites e das seqüências teloméricas (GARNATJE et al., 2004).

## **5. O USO DO SISTEMA-TESTE DE *Allium cepa* EM BANDAMENTOS CROMOSSÔMICOS**

A distribuição da heterocromatina na espécie *A. cepa* é amplamente conhecida. Esta espécie apresenta porções heterocromáticas dispostas quase que somente nas regiões teloméricas de seus cromossomos. Essa posição bem definida da heterocromatina em *A. cepa* e o conhecimento de suas regiões organizadoras nucleolares caracterizam a espécie como um eficiente organismo-teste na avaliação de possíveis alterações induzidas por agentes genotóxicos e mutagênicos, decorrentes da poluição ambiental. Assim, o emprego de técnicas de bandamento cromossômico pode constituir uma metodologia adicional em análises de mutagenicidade, por permitir a detecção de porções cromossômicas que estão relacionadas com os eventos de quebras e perdas, bem como a potencialidade de se avaliar a existência de sítios de maior fragilidade e, conseqüentemente, de maior susceptibilidade às alterações cromossômicas (NUTI RONCHI, 1986). Thiriót-Quévieux (2002) afirma, ainda, que os

estudos de bandeamento revelam detalhes sutis da morfologia cromossômica, da composição química e da atividade gênica de regiões específicas dos cromossomos.

Devido às características de discriminação linear que as técnicas de bandeamentos cromossômicos proporcionam, elas podem constituir um eficiente instrumento na detecção de danos no material genético, causados por efeitos decorrentes da poluição ambiental e, em especial, dos azocorantes.

**“UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO AZOCORANTE BDCP EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*”**

**RESUMO**

O presente estudo avaliou a ação citotóxica, genotóxica e mutagênica de diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 µg/L) de um azocorante (BDCP-Black Dye Commercial Product), usado em indústrias têxteis, por meio de diferentes técnicas citogenéticas (coloração convencional, bandamento C, bandamento RON, bandamento por fluorocromos base-específicos e hibridação *in situ* fluorescente - FISH) aplicadas sobre o organismo teste *Allium cepa*. Pela técnica citogenética de coloração convencional, foi possível verificar que o azocorante induziu morte celular, aberrações cromossômicas, alterações nucleares e micronúcleos. Por meio dos bandamentos cromossômicos e da técnica de FISH, foi possível observar que o BDCP induziu alterações celulares e nucleolares, cujo efeito parece acontecer em regiões específicas dos cromossomos, sugerindo uma sensibilidade maior destas regiões ao corante. Pelas anormalidades celulares observadas, foi possível inferir tanto ação aneugênica como clastogênica para o corante estudado. Mesmo após tratamentos de recuperação das raízes de *A. cepa* em água, os efeitos do BDCP não foram totalmente eliminados, mostrando um potencial acumulativo para o referido corante. Pela ação registrada neste trabalho, o azocorante BDCP pode ser considerado um contaminante potencialmente perigoso para o ambiente e, conseqüentemente, para os organismos a ele expostos.

*Palavras-chave:* Azocorante, células meristemáticas, aberrações cromossômicas, bandamentos cromossômicos, FISH.

## **INTRODUÇÃO**

As indústrias têxteis consomem aproximadamente  $7 \times 10^5$  toneladas/ano de corantes e pigmentos em todo o mundo (NIGAM et al., 1996), sendo 26.500 toneladas (3,8%) utilizadas somente no Brasil (GUARATINI; ZANONI, 2000). Os azocorantes, compostos caracterizados pela presença de um ou mais grupos azo (-N=N-), constituem a mais importante classe de corantes da indústria têxtil, correspondendo de 50 a 65% das formulações comerciais usadas para fins de coloração (CHUNG; STEVENS, 1993; KUNZ et al., 2002). Mais de dois mil produtos desta classe são usados na coloração de poliéster, nylon, diacetato e triacetato de celulose, fibras acrílicas, além de serem usados também no tingimento de couro, plásticos, tintas, papéis, madeira, óleos, cosméticos, medicamentos, metais e alimentos (GORDON; GREGORY, 1983; ZOLLINGER, 1987; USEPA, 1994; RAFFI et al., 1997; EDWARDS, 2000; STOLZ, 2001). Estes corantes são os mais facilmente sintetizados e apresentam excelentes propriedades de fixação e permanência, bem como uma grande variedade de cores, quando comparados aos corantes naturais (GRIFFITHS, 1984; USEPA, 1994). No entanto, durante o processo têxtil, ineficiências da coloração resultam em uma grande quantidade de resíduos, que são diretamente lançados nos corpos d'água e que, conseqüentemente, contaminam o meio ambiente (O'NEILL et al., 1999; MCMULLAN et al., 2001; PEARCE et al., 2003), causando sérios impactos ambientais (HAO et al., 2000).

Muitos estudos têm revelado a presença de corantes no ambiente, onde muitos deles estão envolvidos com contaminações por azocorantes. Segundo vários autores, testes com microorganismos e células de mamíferos apontam os azocorantes como compostos de atividades tóxicas (CLARKE; ANLIKER, 1980; HOLME, 1984; MICHAELS; LEWIS, 1985), genotóxicas e mutagênicas (AMES et al., 1975; VENTURINI; TAMARO, 1979; CHUNG et al., 1981; PRIVAL; MITCHELL, 1982; CLONFERO et al., 1990; FREEMAN et al., 1990; GARG et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008), sendo muitos deles relacionados com o desenvolvimento de câncer de bexiga, sarcomas esplênicos e hepatocarcinomas, em diferentes organismos (NONY et al., 1980; RAFII et al., 1997).

Trabalhos realizados por Umbuzeiro et al. (1994, 2005) e Oliveira (2005) indicaram a presença dos componentes de um azocorante têxtil (BDCP –Black Dye Commercial Product) nos efluentes bruto e tratado de uma indústria de tingimento de poliéster, o que comprometeu

a qualidade da água e do sedimento do recurso hídrico receptor do referido efluente. Os autores registraram, por meio do Teste de *Salmonella*, uma atividade mutagênica para o azocorante. Alves de Lima et al. (2007) demonstraram, por meio do teste de criptas aberrantes, que houve um aumento de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos expostos às concentrações de 1% e 10% deste mesmo efluente que continha o corante BDCP. Estudos de aberrações cromossômicas realizados por Caritá e Marin-Morales (2008), usando o sistema teste *A. cepa*, mostraram mutagenicidade para um efluente industrial contaminado pelo azocorante BDCP, em várias concentrações testadas do efluente. Matsuoka et al. (2001) demonstraram que os compostos PBTA1 e PBTA2 e seus respectivos corantes azo foram citotóxicos para células de hamster CHL e V79-M, pois induziram a formação de células micronucleadas, núcleos multilobulados e intensamente condensados, além de células binucleadas. Os autores também afirmaram que o azocorante precursor do PBTA1 induziu a endoreduplicação nas células V79-MZ de hamster. De acordo com Biswas e Khuda-Bukhsh (2005), o azocorante *p*-dimethylaminobenzene (*p*-DAB) causou efeitos citotóxicos e genotóxicos em células de medula óssea e em espermatozóides de ratos. Todos esses efeitos tóxicos podem ser devido à ação direta dos corantes sobre as células ou, principalmente, da formação de metabólitos, decorrentes da redução da ligação azo (CHUNG; STEVENS, 1993), que são capazes de reagirem com a molécula de DNA, comprometendo a sua estrutura e função (BARTSCH, 1981; ARLT et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005).

Devido ao expressivo aumento de compostos químicos introduzidos no ambiente, muitos bioensaios têm sido realizados para identificar e avaliar os efeitos danosos de vários agentes sobre diversos organismos, em suas diferentes concentrações e tempos de exposição (DE-SERRES, 1992).

Vegetais superiores constituem um importante material para teste das alterações genéticas induzidas por poluentes ambientais e são, atualmente, reconhecidos como excelentes bioindicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes impactados com substâncias tóxicas (GRANT, 1994; YI; MENG, 2003). O uso de vegetais como organismo-teste tem sido indicado e validado por diversas agências ambientais, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP - United Nations Environmental Program), a Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – U.S. Environmental Protection Agency) (MA et al., 1995). A espécie *Allium cepa* tem sido usada como um eficiente organismo padrão para testes

genéticos de toxicidade, principalmente em testes citogenéticos e de aberrações cromossômicas (GRANT, 1982, 1994, 1999; FISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1994; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008). Este organismo teste também apresenta características cromossômicas importantes, como cromossomos grandes e em pequena quantidade ( $2n=16$ ), o que facilita a avaliação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo de divisão celular (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985).

Os ensaios de aberrações cromossômicas têm sido considerados uns dos poucos métodos capazes de detectar mutações em sistemas expostos a substâncias químicas (RANK et al., 2002) e tem sido amplamente utilizado para o monitoramento ocupacional e ambiental, atuando como um biomarcador de efeitos genotóxicos induzidos por carcinógenos (HAGMAR et al., 2004). Dessa maneira, esse teste tem apresentado posição de destaque entre a bateria de testes recomendada para a avaliação de agentes genotóxicos, em testes *in situ*, *in vivo* e *in vitro* (CIMINO, 2006; MATEUCA et al., 2006; WITTE et al., 2007).

O surgimento de novas técnicas de coloração cromossômica aumentou a quantidade de informações sobre a composição e a disposição do DNA de diferentes constituições ao longo dos cromossomos, o que possibilita uma análise mais detalhada da organização estrutural dos cromossomos do que as técnicas convencionais de coloração (ROWLAND, 1981; KIM et al., 2002). Muitas destas técnicas são comumente usadas para caracterizar a constituição cariotípica de espécies vegetais e animais. Dentre elas, o bandamento C, o bandamento AgRON e o bandamento por fluorocromos base-específicos podem ser utilizados como ferramentas eficientes e auxiliares na determinação dos mecanismos de ação de químicos, sobre diferentes organismos.

Estudos realizados por Kihlman (1966), Bourgeois (1974), Pathak et al. (1975), Reeves et al. (1974), Kaina (1977) e Gupta e Sharma (1981) mostraram uma localização preferencial de quebras cromossômicas induzidas por agentes alquilantes associadas à heterocromatina e às bandas definidas nos cromossomos, que puderam ser evidenciadas pela técnica de bandamento C. A alta especificidade das quebras pode estar relacionada a uma maior afinidade de porções de DNA com os agentes mutagênicos, seja pela presença de sítios frágeis ou pela composição de seqüências específicas do DNA, possivelmente, conectadas à matriz nuclear (NATARAJAN; RAPOSA, 1975).

Como descrito acima, os azocorantes e seus metabólitos têm uma potencialidade reconhecida de causar sérios danos ao DNA, havendo, contudo uma eminente necessidade de se avaliar melhor os modos de ação desses corantes sobre os materiais biológicos. O corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), amplamente usado em indústrias de processamento têxtil e presente em efluentes industriais lançados no Ribeirão dos Cristais – SP/Brasil, foi estudado neste trabalho em testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em *A. cepa*. Neste estudo, foram usadas diferentes técnicas citogenéticas (coloração convencional: teste de aberrações cromossômicas e nucleares; bandamentos cromossômicos: bandamento C, bandamento RON, bandamento por fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub>/DAPI; Hibridação *in situ* fluorescente - FISH), sobre células meristemáticas de *A. cepa*, com o objetivo de analisar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico do BDCP, bem como avaliar os possíveis associações deste corante com o material genético e, assim, evidenciar a sua ação sobre as células dos organismos expostos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi avaliado neste trabalho, o azocorante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), que é composto por três corantes pertencentes ao grupo dos nitro-aminoazobenzenos: C.I. Disperse Blue 373 (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>; CAS n° 51868-46-3); C.I. Disperse Violet 93 (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>; CAS n° 268221-71-2) e C.I. Disperse Orange 37 (C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>; CAS n° 13301-61-6), cujas estruturas moleculares (UMBUZEIRO et al., 2005), podem ser visualizadas na Figura 1.

Para a realização do estudo, foram usadas as concentrações de 1000 µg/L, 100 µg/L, 10 µg/L e 1 µg/L do corante comercial, preparadas imediatamente antes da realização dos experimentos. A maior concentração utilizada foi determinada por meio de testes-piloto e as outras concentrações foram obtidas a partir de sucessivas diluições da maior concentração do corante em água ultrapura. As concentrações foram obtidas para se equipararem os estudos com a realidade das contaminações observadas em um rio comprometido com este mesmo corante, onde foram detectadas concentrações para dois dos três corantes constituintes do produto comercial: 57,9 µg/L de C.I. Disperse Blue 373 e 316 µg/L de C.I. Disperse Orange 37, nas amostras de efluente bruto; e concentrações de 67 µg/L de C.I. Disperse Blue 373 e 126 µg/L de C.I. Disperse Orange 37, nas de efluente tratado (OLIVEIRA et al., 2007).

A espécie *Allium cepa* foi usada para avaliação dos mecanismos de ação do químico testado. Nesse estudo, sementes de *A. cepa* ( $2n=16$ ) de uma única variedade (Baia Periforme) foram utilizadas como organismo-teste, por serem genética e fisiologicamente homogêneas, e por estarem disponíveis durante o ano inteiro, seguindo indicações descritas em Caritá e Marin-Morales (2008). Segundo estes autores, essas características evitam diferentes respostas nos vários ensaios realizados, assegurando resultados confiáveis.

Sementes de *A. cepa* foram germinadas, a temperatura ambiente ( $21 \pm 4$  °C), em placas de Petri cobertas com papel de filtro embebido em água ultrapura. Quando as raízes atingiram aproximadamente 1,5 cm de comprimento, elas foram transferidas para placas de Petri cobertas com papel de filtro embebido com as diferentes concentrações do corante comercial (1000 µg/L, 100 µg/L, 10 µg/L e 1 µg/L), sendo uma placa para cada concentração, permanecendo nessas placas por um período de 20 horas. O controle negativo foi realizado com água ultrapura e o controle positivo com a concentração de  $9 \times 10^{-5}$  M de metilmetanosulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3). Decorrido este tempo, algumas raízes foram coletadas de cada placa e o restante delas foi transferido para placas contendo apenas água ultrapura, por um período de 48 horas (tratamento de recuperação), sendo, após este período, realizadas novas coletas de raízes. Novas coletas foram realizadas após 24 horas, para estudo de um tratamento de recuperação por 72 horas.

As raízes coletadas foram fixadas em solução de Carnoy (Álcool-Ácido Acético 3:1 – v/v), por 18 horas, em temperatura ambiente. A confecção de lâminas foi feita pela técnica de coloração convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares), de bandamentos cromossômicos (bandamento C, bandamento RON, bandamento por fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub>/DAPI) e de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

Para o ensaio de coloração convencional, as raízes fixadas foram coradas pela reação de Feulgen, como descrito por Feulgen e Rossenbeck, apud Mello e Vidal (1978), com algumas modificações. As raízes foram hidrolisadas em HCl 1M, a 60°C, por 8 minutos. Após três banhos de 5 minutos em água destilada, as raízes foram transferidas para frascos com reativo de Schiff, por 2 horas, em local escuro. Após a coloração, as regiões meristemáticas das raízes foram esmagadas, cuidadosamente, em uma gota de solução de carmim acético a 2%. A montagem das lâminas foi feita em resina sintética (Mounting Media, Permout®, Fisher Scientific), para serem analisadas em microscópio de luz.



Para as análises de aberrações cromossômicas e nucleares, vários tipos de aberrações foram considerados: perda de material genético, aderência cromossômica, C-metáfase, ponte cromossômica, multipolaridade, poliploidia e broto nuclear. Para melhor interpretação dos resultados, as aberrações cromossômicas e nucleares (ACN) foram classificadas em uma única categoria, considerada como um *endpoint* de genotoxicidade. A presença de micronúcleos e quebras cromossômicas (MN/Q) nas células meristemáticas de *A. cepa* foi considerada como um *endpoint* de mutagenicidade, avaliado separadamente das ACN. Células em processos de morte celular, tanto apoptóticas como necróticas, (AP/NE) foram analisadas à parte e consideradas como um *endpoint* de citotoxicidade. O Índice Mitótico – IM (relação do número de células em divisão sobre o total de células analisadas) foi outra categoria analisada, também indicativa de citotoxicidade. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e foi contabilizado um total de 10.000 células por concentração testada e por tratamento (20 horas, e recuperação de 48 e 72 horas), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 20 lâminas (10 lâminas para cada bateria de experimentos). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (VIEIRA, 2004), aceitando a probabilidade de 0,05 para indicar um efeito significativo.

Para o preparo das lâminas de Bandamentos C, RON, CMA<sub>3</sub>/DAPI e Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), os meristemas radiculares foram pré-tratados com solução enzimática de celulase/pectinase (2:20 – v/v), por 60 minutos, seguido por um banho de 2 minutos em água destilada. Os meristemas foram suavemente esmagados em uma gota de solução de ácido acético a 45%. As lâminas foram deixadas para envelhecer, por 6-7, 8-15 e 25-32 dias para os experimentos de Bandamentos C, CMA<sub>3</sub>/DAPI, e FISH, respectivamente. Os experimentos de bandamento RON foram realizados sem envelhecimento prévio das lâminas.

O Bandamento C foi desenvolvido de acordo como o protocolo da técnica descrito por Schwarzacher et al. (1980), como segue: as lâminas foram incubadas, por 10 minutos, em solução de ácido acético a 45%, à temperatura ambiente, seguida de uma lavagem rápida em água destilada. Após incubação em solução saturada de hidróxido de bário (Ba (OH)<sub>2</sub> 5%), por 10 minutos, à temperatura ambiente, e uma rápida lavagem em HCl 0,2M a 60° C, as lâminas foram lavadas em água destilada, e incubadas em 2xSSC a 60° C, por 90 minutos e, novamente, lavadas em água destilada. A coloração das lâminas foi realizada com solução de Giemsa a 4%, durante 20 minutos. As lâminas foram montadas em resina sintética (Mounting

Media, Permout®, Fisher Scientific), para serem analisadas em microscópio de luz. Os mesmos tipos de alterações celulares considerados no ensaio citogenético de coloração convencional foram qualitativamente analisados nas lâminas de bandamento C. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, sendo confeccionadas, no total, 10 lâminas por concentração testada e por tratamento (20 horas, recuperação de 48 e 72 horas).

Os experimentos de Bandamento AgRON foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Hizume et al. (1980). Uma gota de solução coloidal (gelatina a 1%) e duas gotas de AgNO<sub>3</sub> a 50% foram adicionadas às lâminas pré-preparadas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em banho-maria a 60° C, por 5 a 6 minutos ou até que o material da lâmina apresentasse uma cor marrom-dourado. Em seguida, as lâminas foram montadas em resina sintética (Mounting Media, Permout®, Fisher Scientific), para serem analisadas em microscópio de luz.

As lâminas do Bandamento RON foram avaliadas quanto à presença de possíveis alterações nas células e núcleos interfásicos, bem como pela quantificação da variação do número de nucléolos nas células, comparando as diferentes concentrações e tratamentos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e foi contabilizado um total de 5.000 células por concentração testada e por tratamento (20 horas, recuperação de 48 e 72 horas), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 10 lâminas (5 lâminas para cada bateria de experimentos). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ou teste H (VIEIRA, 2004), com nível de significância de 0,05.

Os experimentos de Bandamento por fluorocromos base-específicos (CMA<sub>3</sub>/DAPI) seguiram a metodologia proposta por Deumling e Greilhuber (1982). Após o preparo das lâminas, como descrito na técnica anterior, foi adicionada sobre o material uma gota de cromomicina (CMA<sub>3</sub> a 0,5 mg/mL). As lâminas foram cobertas por lamínulas, onde o CMA<sub>3</sub> agiu por 1 hora. Posteriormente, as lamínulas foram removidas com jatos de água destilada e deixadas para secar em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se em cada lâmina o fluorocromo 4'-6-diamidina-2-fenilindol (DAPI a 2 µg/mL), sendo as lâminas cobertas por lamínulas por um período de 30 minutos. Após este tempo, as lamínulas foram removidas com jatos de água destilada e secas a temperatura ambiente. A montagem das lâminas foi feita com meio de montagem (solução de glicerol para fluorescência + tampão McIlvaine pH 7,0 + MgCl<sub>2</sub> 1M). As lâminas foram observadas e analisadas em fotomicroscópio de fluorescência (filtros 450-490 nm para o CMA<sub>3</sub> e 320-380 nm para o DAPI), no mínimo, 15 dias após a sua

confeção. Todos os ensaios realizados com os corantes fluorescentes foram desenvolvidos em ambiente escuro. As lâminas resultantes do Bandamento CMA<sub>3</sub>/DAPI foram qualitativamente analisadas, considerando possíveis alterações celulares, como aquelas evidenciadas pela técnica citogenética de coloração convencional. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, sendo confeccionadas, no total, 10 lâminas por concentração testada e por tratamento (20 horas, recuperação de 48 e 72 horas).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) seguiu o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986), com modificações descritas em Martins e Galetti (1999). Foi usada a sonda de DNAr 45S, produzida a partir do genoma de *Passiflora*. As lâminas com as preparações citológicas foram incubadas em uma solução de RNase (40 µg/ml), por 90 minutos, em estufa a 37°C; lavadas duas vezes em 2xSSC, por 10 minutos; desidratadas em etanol (série de 70-100%), a -20°C, por 10 minutos; mergulhadas em formamida a 70%, por 5 minutos; desidratadas em uma série de etanol e deixadas para secar ao ar livre. A marcação da sonda de DNAr 45S de *Passiflora* foi realizada por meio da incubação da mistura de 18 µL de água ultrapura autoclavada, 3 µL de sonda, 3 µL de dNTP mix e 3 µL de mix de enzima 10x, por 40 min, a 16°C, em termociclador. Posteriormente, foi realizada a precipitação da sonda com a adição de 1 µL de tampão de bloqueio, 3 µL de acetato de sódio 3M e 60 µL de etanol absoluto gelado, em freezer, a -80°C, por 1 hora. Após a centrifugação do material a 15.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado etanol 70% gelado, para a lavagem do material. Após nova centrifugação do material, o sobrenadante foi descartado e o material restante foi seco em estufa a 37°C. A solução de hibridação (30 µL de formamida + 12 µL de sulfato de dextrano 50% + 6 µL de 20xSSC) foi desnaturada a 95°C, por 10 minutos e, imediatamente, resfriada em gelo, por mais 10 minutos. Foram aplicados em cada lâmina 20 µL de solução de hibridação, a 37°C, em câmara úmida "overnight". As lâminas foram lavadas em 2xSSC, a temperatura ambiente, e em formamida 50%, por 15 minutos, a 37 °C. Foram realizadas mais duas lavagens das lâminas com 2xSSC, por 15 minutos (37°C e a temperatura ambiente). Em seguida, fez-se uma lavagem com 4xSSC, por 15 minutos, a temperatura ambiente. A detecção da sonda foi realizada com uma solução de avidina-FITC 0,07% (em tampão C), em estufa, a 37°C, por 1 hora. Foram realizadas três lavagens, de 5 minutos cada, em tampão de bloqueio (11,34g de NaHCO<sub>3</sub>; 0,162g de citrato de sódio; 69,42 µL de Triton 100; 900 mL de água destilada e 9g de leite em pó Molico<sup>®</sup> desnatado), a 42°C,

em banho Maria. Sobre as lâminas, foram colocados 80 µL de anticorpo anti-avidina biotina conjugada, por 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Novas lavagens com tampão de bloqueio foram realizadas, seguidas da repetição dos passos FITC-anticorpo, por duas vezes, a fim de aumentar o sinal de hibridação. As lâminas foram lavadas duas vezes em 4xSSC e Triton 2%, a temperatura ambiente. As preparações foram montadas em 20 µL de “antifading” (Vectashield antifade vector) e a contra-coloração dos cromossomos foi realizada com iodeto de propídio a 50 µg/mL. As lâminas foram observadas e analisadas, qualitativamente, em fotomicroscópio de fluorescência (filtro 450-490 nm), de modo que as melhores lâminas com alterações celulares foram fotodocumentadas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### A. Ensaio de Coloração Convencional

A taxa de citotoxicidade de um composto químico pode ser determinada com base no aumento ou diminuição dos seus I.M., sendo que esses valores podem ser usados como um parâmetro de citotoxicidade em estudos de toxicologia ambiental (SMAKA-KINCL et al., 1997; FERNANDES et al, 2007). Os resultados dos I.M. das células meristemáticas de *A. cepa* expostas às quatro concentrações do corante BDCP (1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L e 1000 µg/L), à água ultrapura (controle negativo - CN) e ao MMS ( $9 \times 10^{-5}$  M - CP), obtidos a partir do ensaio de coloração convencional, não apresentaram diferenças significativas entre si, como pode ser visto na Tabela 1.

Resultados não significativos de citotoxicidade também foram registrados por Caritá e Marin-Morales (2008), quando os autores estudaram diluições de um efluente contaminado pelo mesmo corante BDCP. Como as diferenças registradas para os I.M. dos ensaios realizados neste estudo com o corante BDCP e nos estudos desenvolvidos por Caritá e Marin-Morales (2008) com efluente contaminado com o corante BDCP não foram significativas, em relação aos resultados do CN, este parâmetro parece não se caracterizar em um bom indicador da citotoxicidade das concentrações testadas do referido corante.

As frequências de ACN, MN/Q e AP/NE, observadas para células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao azocorante BDCP, para os tratamentos de 20 horas e para os tratamentos de recuperação por 48 e 72 horas, mostraram que apenas as três maiores concentrações do

corante (10, 100 e 1000  $\mu\text{g/L}$ ), no tratamento de 20 horas, apresentaram, na somatória de efeitos, valores significativos em relação aos resultados do testes controle negativo (Tabelas 2 a 4).

No presente estudo, as ACN foram consideradas *endpoints* de genotoxicidade, por se tratarem de danos no material genético das células que podem não ser fixados no organismo, por serem passíveis de reparo ou ainda por levar a uma total inviabilidade da célula, o que não torna o efeito transmissível às células descendentes, não se caracterizando, assim, em uma mutação.

As ACN (*endpoints* de genotoxicidade), observadas no presente estudo, foram visualizadas em todos os estágios do ciclo celular: intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Dentre as ACN, foram observados: na intérfase, brotos nucleares e células poliplóides; na prófase, perdas de material genético; na metáfase, aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, C-metáfases e poliploidias; na anáfase e telófase, multipolaridades, pontes e perdas cromossômicas (Figura 2).

As freqüências de ACN, em todos os tratamentos realizados com o corante, foram sempre superiores às encontradas nos testes controle negativo, sendo a maioria delas estatisticamente significativas, com exceção da concentração de 100  $\mu\text{g/L}$  (tratamento de recuperação de 48 horas) e da concentração de 1  $\mu\text{g/L}$  (tratamento de recuperação de 72 horas). A redução das freqüências de ACN, para a concentração de 1  $\mu\text{g/L}$ , foi significativa somente após o tratamento de recuperação de 72 horas. Observou-se, ainda, que apenas a concentração de 1.000  $\mu\text{g/L}$  exibiu um decréscimo significativo nas freqüências de ACN, após os tratamentos de recuperação de 48 e 72 horas.

Pelas altas e significativas freqüências de ACN registradas para os meristemas radiculares de *A. cepa* expostos às diferentes concentrações do azocorante (Tabelas 2 a 4), podemos inferir que este corante apresenta ação genotóxica, o que corrobora os dados apresentados por Caritá e Marin-Morales (2008), que descrevem a presença de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a efluentes contaminados com este mesmo azocorante (BDCP). É importante considerar que a significativa redução das freqüências de ACN para a maior concentração testada do azocorante (1000  $\mu\text{g/L}$ ), após os tratamentos de recuperação de 48 e 72 horas, pode ser decorrente de uma possível recuperação das células de *A. cepa*, após normalização das condições ambientais, o que indica um efeito não acumulativo do referido corante sobre as células expostas.

Também foram realizadas análises estatísticas de todos os tipos de ACN, em separado, pois cada tipo de ACN pode ser induzido por mecanismos específicos, possibilitando uma melhor avaliação do modo de ação dos componentes do corante BDCP sobre os organismos expostos.

As perdas cromossômicas, resultantes de falha na formação do fuso mitótico, são, segundo Marcano et al. (2004), potenciais causadoras de células aneuplóides. No presente estudo, a frequência significativa de perdas de material genético registradas nas prófases dos meristemas submetidos à concentração mais alta do BDCP, juntamente com os valores significativos de perdas cromossômicas em metáfase, anáfase e telófase, decorrente da ação das três maiores concentrações (para o tratamento de 20h) (Tabela 2), evidenciam um mecanismo de ação aneugênica para o azocorante BDCP.

Embora tenham sido encontradas metáfases com aderências cromossômicas em todos os tratamentos realizados com o corante BDCP, resultados significativos em relação ao controle negativo só foram registrados para as quatro concentrações testadas nos tratamentos de 20 horas, para duas concentrações do tratamento de 48 horas (10 e 100 µg/L) e para a concentração de 10 µg/L do tratamento de 72 horas (Tabelas 2 a 4; Figura 2). Estes dados mostraram que o BDCP promoveu aderências cromossômicas em células de *A. cepa*, mas que este efeito não persistiu após o tratamento de recuperação (simulação da volta das condições normais do ambiente) de 72 horas, o que sugere que o corante não teve efeito acumulativo sobre estas células, com exceção da concentração de 10 µg/L do azocorante, que induziu um aumento de células com aderências cromossômicas.

A presença de aderências cromossômicas, segundo Marcano e Del Campo (1995), Türkoglu (2007) e Leme et al. (2008), pode sinalizar um efeito genotóxico do agente indutor do dano, cuja consequência da ação pode levar a comprometimentos irreversíveis à célula, inclusive à sua morte, efeito este também observado neste estudo. A presença de aderências cromossômicas reforça as evidências da ação aneugênica do BDCP, já descritas para as perdas cromossômicas citadas anteriormente. A inativação do fuso mitótico, decorrente do efeito aneugênico do BDCP, leva a um impedimento da migração dos cromossomos para os pólos das células, bloqueando a divisão celular em metáfase. Os cromossomos, não migrando, permanecem em processo de condensação, tornando-se também cada vez mais próximos entre si, caracterizando às referidas aderências cromossômicas. Sabe-se que a aderência cromossômica é um fenômeno citogenético amplamente descrito em plantas. Embora sua

primeira descrição tenha sido feita por Köernicke, no início do século XX, o termo *stickiness* foi empregado pela primeira vez em 1932, por Beadle, para descrever o aspecto pegajoso de cromossomos de milho, em células que haviam sofrido uma mutação recessiva (apud GIACOMELLI, 1999).

As C-metáfases podem ser originadas pela ação de agentes aneugênicos sobre as células, cujos compostos promovem uma completa inativação do fuso mitótico da célula (FISKESJÖ, 1985 e 1993; FERNANDES et al., 2007). Estas alterações podem gerar outros tipos de anormalidades celulares, tais como células poliplóides (ODEIGAH et al., 1997; FERNANDES et al., 2007), células multinucleadas e portadoras de micronúcleos (KRISCH-VOLDERS et al., 2002; FERNANDES et al., 2007). Estudos realizados por Caritá e Marin-Morales (2008) mostraram a presença de células portadoras de C-metáfases e de micronúcleos, após exposição a efluentes contaminados com azocorantes BDCP. Nossas análises indicaram a presença de baixas frequências de C-metáfases nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos testes com o azocorante BDCP, com exceção dos valores estatisticamente significativos apresentados pelos meristemas submetidos à concentração de 1 µg/L, após tratamento de recuperação de 48 horas (Tabela 3), o que já nos sugere uma possível ação aneugênica deste corante sobre as células de *A. cepa*. Porém, os dados discrepantes observados entre os resultados aqui apresentados e os de Caritá e Marin-Morales (2008) podem estar relacionados com um efeito sinérgico, possivelmente, do corante com outros componentes do efluente estudado por aqueles autores.

Pontes cromossômicas devem ser decorrentes de terminações cromossômicas coesivas ou rearranjos estruturais (FISKESJÖ, 1993) ou ainda de aderências cromossômicas (GIACOMELLI, 1999; MARCANO et al., 2004) que, neste último caso, segundo os últimos autores citados, podem ser múltiplas e persistirem até a telófase. No presente estudo, foram observadas frequências de pontes cromossômicas sempre superiores às observadas nos testes controle negativo, porém frequências significativas desta alteração em anáfase e telófase foram registradas para células expostas aos tratamentos de 20 (concentração de 10 µg/L) e 48 horas (concentrações de 10 µg/L, 100 µg/L e 1000 µg/L) (Tabelas 2 a 3), o que reforça a ação aneugênica deste químico, sugerida anteriormente para aderência e perdas cromossômicas.

De acordo com Rank e Nielsen (1998), anáfases multipolares resultam de uma disfunção do fuso mitótico, que leva a um desbalanço na distribuição de cromossomos, organizando-os em mais que dois pólos dentro da célula, evento contrário ao que ocorre no

ciclo de divisão celular normal. Segundo Fernandes et al. (2009), anáfases multipolares podem ser decorrentes de ação aneugênica, onde os cromossomos duplicados não migram para pólos opostos, mas os centros organizadores de microtúbulos sim. Em um novo evento de divisão, os cromossomos novamente duplicados migram para mais de dois pólos estabelecidos na célula, que foram originados da somatória dos eventos de divisão de centros organizadores de microtúbulos anteriormente estabelecidos com os da divisão atual. As anáfases multipolares com pontes cromossômicas também podem levar à formação de núcleos lobulados, uma vez que a presença de multipolaridade e as pontes parecem não evitarem a reorganização do envoltório nuclear. Neste caso, a membrana envolveria o material genético que está desorganizado dentro da célula, resultando na formação de núcleos lobulados (FERNANDES et al. 2009). A poliploidia, evento que origina células com várias cópias do conjunto cromossômico, pode ser induzida pela ausência do fuso mitótico funcional e uma conseqüente falha na migração das cromátides para os pólos (ELHAJOUJI et al., 1998). Em nossos experimentos, foram observados valores não significativos de células multipolares, nos estágios de anáfase e telófase, de núcleos lobulados e de células poliplóides na intérfase e na metáfase, para as células de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações e tratamentos do azocorante (Tabelas 2 a 4).

Pela análise conjunta das ACN consideradas neste trabalho como *endpoints* de genotoxicidade (perdas, aderências, brotos, C-metáfases, poliploidias, pontes e células multipolares), foi observado que existe uma diferença estatisticamente significativa entre as células de *A. cepa* expostas ao corante, em relação aos resultados do controle negativo (Tabelas 2 a 4). Coincidentemente, todas as alterações consideradas são decorrentes de mecanismos de ação aneugênica, o que confirma mais uma vez, a ação aneugênica do corante BDCP.

Micronúcleos e quebras cromossômicas são excelentes *endpoints* relacionados à mutagenicidade, pois são alterações no material genético, seja nos cromossomos ou no DNA, que não podem mais ser reparadas pelas células e que podem ser repassadas para as novas gerações celulares, sendo, portanto, facilmente fixadas nos organismos (VENTURA et al., 2008). As frequências de MN/Q, registradas para todos os tratamentos realizados com o corante, foram sempre superiores e estatisticamente significativas às encontradas no teste controle negativo, com exceção das duas menores concentrações testadas no tratamento de recuperação por 48 horas (1 e 10 µg/L) e nos tratamentos de recuperação por 72 horas



(Tabelas 2 a 4). Estes resultados mostram que o corante BDCP é mutagênico nas referidas concentrações. O decréscimo significativo nas frequências de micronúcleos e quebras cromossômicas, verificado após o tratamento de recuperação de 72 horas em água ultrapura (Tabela 4), indica que o azocorante provoca efeitos mutagênicos em *A. cepa*, enquanto houver exposição a ele, mas que não parece agir de forma cumulativa nestas células.

Pelas frequências significativas de micronúcleos observadas para 3 concentrações testadas do corante (tratamento de 20 horas) e para as 2 maiores concentrações (tratamento de 48 horas) (Tabelas 2 e 3), pode-se afirmar que o azocorante BDCP apresenta uma ação mutagênica. Estes dados confirmam a atividade mutagênica deste azocorante, conforme descrito por Umbuzeiro et al. (2005), obtido em teste com *Salmonella*, e por Caritá e Marin-Morales, em testes com *A. cepa*, após avaliarem os efeitos de efluentes contaminados com este mesmo químico.

Os MN presentes nas células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição ao azocorante BDCP, não foram homogêneos, pois exibiram diferentes tamanhos (Figura 3). De acordo com Leme et al. (2008), o tamanho de MN de células de *A. cepa* é um dos parâmetros que pode determinar se um agente é clastogênico ou aneugênico, pois esta espécie possui cromossomos de tamanho grande e homogêneo (FISKESJÖ, 1993), o que dá certa fidelidade ao diagnóstico. Segundo Yamamoto e Kikuchi (1980), micronúcleos derivados de agentes clastogênicos são, geralmente, menores que os micronúcleos derivados de ação aneugênica. A presença de micronúcleos de tamanhos variados, observados neste estudo, também é um forte indicativo de que o azocorante BDCP apresenta tanto uma ação aneugênica como clastogênica, reforçando as sugestões anteriormente apresentadas. No entanto, o uso de metodologias adicionais, como técnicas de bandamentos cromossômicos e hibridação *in situ* fluorescente, pode ser útil na determinação das vias exatas da formação de micronúcleos.

Fragmentos cromossômicos podem ser derivados de quebras nas pontes cromossômicas, as quais podem ser originadas de translocações ou de terminações cromossômicas coesivas (FISKESJÖ, 1993). Foram observadas frequências significativas de quebras cromossômicas nas fases de metáfase, anáfase e telófase (Figura 3), para as 2 maiores concentrações testadas do azocorante BDCP (tratamento de 20 horas), bem como para a menor concentração do tratamento de 48 horas, evidenciando uma ação direta do azocorante sobre a molécula de DNA das células de *A. cepa*, reforçando assim o seu potencial mutagênico e sua ação clastogênica.

Segundo Kaioumova et al. (2001), a ação de agentes químicos sobre células pode levar a uma seqüência complexa de eventos, que podem resultar em morte celular. Altas freqüências de células em processo de morte podem ser, portanto, consideradas *endpoints* relacionados à citotoxicidade, pois são alterações que interferem, diretamente, na viabilidade celular, comprometendo, conseqüentemente, diferentes processos fisiológicos dos organismos. O presente estudo mostrou freqüências significativas de células em processo de morte celular (apoptótica e necrótica) nos meristemas de *A. cepa* expostos às quatro concentrações testadas do azocorante no tratamento de 20 horas, à maior concentração no tratamento de 48 horas e às duas maiores concentrações no tratamento de 72 horas (Tabelas 2 a 4, Figura 4). Estes resultados mostram que o azocorante BDCP foi citotóxico para as referidas concentrações. A redução significativa nas freqüências de morte celular (apoptose ou necrose), verificada após os tratamentos de recuperação em água ultrapura, indica que, em relação aos danos citotóxicos, o efeito do corante pode ser minimizado com a volta das condições normais, e que o azocorante não apresenta efeitos cumulativos sobre as células meristemáticas do sistema-teste *A. cepa*.

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas quando se consideraram apenas as freqüências de necrose, que, segundo Zakeri e Lockshin (2002), é um fenômeno que envolve, simultaneamente, muitas células e que é resultado de injúrias sofridas pelas células, levando-as a um comprometimento metabólico e, por fim, à morte celular. Esses mesmos autores afirmam que há vários tipos de morte celular observadas em plantas, tais como: morte espontânea, como, por exemplo, a queda das flores; mortes ativadas por mecanismos oxidativos ou de estresse; mortes induzidas por agentes infecciosos ou por componentes químicos tóxicos, aparentemente funcionando como um mecanismo de defesa do organismo; e mortes induzidas por hipersensibilidade desse mecanismo de defesa. Durante a necrose, as células primeiramente incham, a membrana plasmática se rompe, promovendo uma rápida lise das células (MAJNO; JORIS, 1995).

Diferentemente da necrose, o termo apoptose pode ser atribuído ao processo de eliminação celular sem um rompimento aparente da membrana plasmática (PROSKURYAKOV et al., 2003). Morfologicamente, as células, primeiramente, reduzem-se e os seus núcleos condensam-se, desintegrando-se, formando estruturas denominadas de corpos apoptóticos (MAJNO; JORIS, 1995). Em relação às freqüências de células apoptóticas, verificou-se diferença significativa, em relação ao teste controle negativo,

somente para a concentração mais alta (1000 µg/L) no tratamento de 20 horas com o corante. Após a realização dos tratamentos de recuperação, para a concentração de 1000 µg/L, observou-se uma nítida redução das freqüências de células apoptóticas, as quais mostraram diferenças estatisticamente significativas, daquelas verificadas no tratamento de 20 horas (Tabelas 2 a 4), indicando que os meristemas podem se recuperar da ação citotóxica do corante, após a normalização das condições de exposição.

Os dados referentes a todas as anormalidades celulares (ACN, MN/Q e AP/NE), observadas para o tratamento de 20 horas (Tabela 2), indicaram que quanto maior a concentração do azocorante testado, maior a freqüência de células danificadas, caracterizada por uma relação dose-resposta positiva para o organismo-teste de *A. cepa*. Estes dados comprovam uma ação citotóxica, genotóxica e mutagênica para o corante comercial BDCP aqui estudado. Como a concentração mais alta induziu freqüências significativas de anormalidades celulares (ACN+MN/Q+AP/NE), ela foi considerada a de maior potencial tóxico ao organismo-teste utilizado nos nossos ensaios. Além disso, a redução gradativa na freqüência total de células alteradas, após os tratamentos de recuperação de 48 e 72 horas (Tabelas 3 e 4), indica que, para *A. cepa*, o azocorante BDCP não apresenta efeito cumulativo, comprovado pelo tratamento de recuperação de 72 horas, que apresentou freqüências de ACN+MN/Q+AP/NE significativamente mais baixas que as observadas para o tratamento de 20 horas.

Por todo o exposto, pode-se inferir, ainda, que o principal mecanismo de ação do corante comercial BDCP é o de caráter aneugênico. Anthony e Hussey (1999) e Fernandes et al. (2007, 2009) demonstraram que o herbicida trifluralina tem uma ação aneugênica atribuída, principalmente, à presença de um grupo NO<sub>2</sub>, que se liga às moléculas de tubulina, evitando sua polimerização e, conseqüentemente, a formação de microtúbulos. De acordo com Tsuboy et al. (2007), o potencial mutagênico dos azocorantes está diretamente relacionado ao tipo e posição dos substituintes, tais como o anel aromático e o átomo de nitrogênio na porção amino. Sabendo-se que o corante comercial BDCP possui 3 diferentes componentes – o azul (C.I. Disperse Blue 373), o violeta (C.I. Disperse Violet 93) e o laranja (C.I. Disperse Orange 37) – que apresentam os grupos NO<sub>2</sub> (UMBUZEIRO et al., 2005), sugere-se que eles atuem de maneira semelhante ao herbicida citado, ligando-se às moléculas de tubulina, causando distúrbios na formação do fuso mitótico durante o ciclo celular e contribuindo com a formação de ACN, como as perdas cromossômicas, aderências

cromossômicas, C-metáfases, pontes cromossômicas, poliploidias e multipolaridades, além da formação de micronúcleos.

### B. Bandamento C

A aplicação da técnica de Bandamento C é indicada para a localização de regiões heterocromáticas dos cromossomos. Os testes controle negativo, desenvolvidos neste estudo, mostraram blocos de heterocromatina espalhados pelo núcleo das células interfásicas e marcações C-positivas nas regiões teloméricas das células mitóticas da espécie *A. cepa*, como pode ser observado na Figura 5, confirmando os estudos realizados por Kim et al. (2002), que verificaram essa mesma localização C-positivas na região telomérica de cromossomos desta espécie.

Dentre as alterações celulares analisadas pela metodologia de coloração convencional, resultantes da ação das diferentes concentrações e tratamentos com o corante comercial BDCP, algumas mostraram maiores detalhes após aplicação da metodologia de bandamento C, como as quebras cromossômicas, pontes cromossômicas, micronúcleos e células em processo de morte.

As quebras cromossômicas podem estar relacionadas com uma maior afinidade de algumas regiões do DNA com agentes mutagênicos, seja pela presença de sítios de maior fragilidade ou pela composição de seqüências específicas do DNA, possivelmente conectadas à matriz nuclear (NATARAJAN; RAPOSA, 1975). Estudos realizados por Kihlman (1966), Bourgeois (1974), Pathak et al. (1975), Reeves et al. (1974), Kaina (1977) e Gupta e Sharma (1981) mostraram uma localização preferencial de quebras cromossômicas induzidas por agentes alquilantes, freqüentemente associadas à heterocromatina e a bandas definidas dos cromossomos. Foram observados neste trabalho pequenos fragmentos cromossômicos com marcações C-positivas (Figura 5) nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas às duas maiores concentrações do azocorante no tratamento de 20 horas, os quais indicam ser derivados de quebras nas regiões terminais de cromossomos, concordando com estudos realizados por Nuti Ronchi et al. (1986), que afirmam que a maioria das quebras cromossômicas em *A. cepa* ocorre em regiões teloméricas constituídas de heterocromatina. Também foram observados fragmentos cromossômicos maiores nas células expostas à maior concentração do azocorante, que mostraram ser compostos, basicamente, de eucromatina,

sugerindo que a quebra deve ter ocorrido em uma região mais intercalarmemente disposta no cromossomo. A perda de porções cromossômicas, mesmo que sejam constituídas de material sem expressão gênica direta, pode decorrer em inviabilidade celular e, até mesmo, em um comprometimento da espécie em futuros eventos de especiação (HATCH et al., 1976).

A ausência de marcações C-positivas (Figura 5) na região mediana da grande maioria das pontes cromossômicas indica que essas alterações podem ser derivadas de quebras ocorridas nas regiões teloméricas dos cromossomos, decorrendo em terminações coesivas, que se juntaram, ligando as cromátides entre si. Este resultado pode confirmar as afirmações de Fiskesjö (1993), onde o autor cita que pontes cromossômicas podem ser originadas por translocações ou simplesmente por terminações coesivas.

Entre as células portadoras de micronúcleos, foi possível observar que algumas apresentaram micronúcleos com marcações C-positivas, enquanto outras não (Figura 5). A variação do grau de condensação da cromatina dos micronúcleos (Figura 5), independentemente da concentração do corante e do tratamento aplicado aos meristemas de *A. cepa*, indica uma possível influência deste químico sobre a expressão gênica das células de *A. cepa*. A presença de MN sem marcações C-positivas, pode indicar ainda um efeito mais severo do corante sobre as células expostas, pois se os MN não apresentam heterocromatina em sua constituição é porque não apresentam porções teloméricas dos cromossomos, sendo então decorrentes de duplas quebras no cromossomo. Adicionalmente, foram observados núcleos com cromatina totalmente condensada (Figura 5) nas células meristemáticas expostas à maior concentração testada do azocorante, para todos os tratamentos, o que pode ser considerado um forte indício de indução de morte celular, que confirma a ação citotóxica para o azocorante estudado neste trabalho.

### C. Bandamento RON

O nitrato de prata tem afinidade por proteínas nucleolares, sendo utilizado para o bandamento de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) ativas no último ciclo celular. Morielle (2004) afirma que a localização dos componentes nucleolares, durante a mitose, é variável, sendo que cada componente retorna ao seu local de origem para a formação do nucléolo no próximo ciclo celular. A partir das análises das lâminas de bandamento RON, foi observada uma localização variável das proteínas nucleolares acídicas durante a divisão

celular, as quais foram visualizadas, tanto próximas da periferia dos cromossomos, como distribuídas no citoplasma durante a prófase e a telófase (Figura 6), corroborando estudos realizados por Medina et al. (1995) com células de raízes de *A. cepa*.

Após a exposição das células meristemáticas a todas as concentrações e tratamentos com o azocorante BDCP, verificou-se que a maioria dos MN apresentou região organizadora de nucléolo (Figura 6). A presença de RONS nos MN mostra que o azocorante pode agir diretamente em regiões relacionadas a sítios de DNAr, que são imprescindíveis em processos de transcrição e tradução protéica. Estudos realizados por Cermeño et al. (1984) mostraram que a perda ou inativação de RONS podem estar relacionadas a fatores como deleção ou translocação. Por outro lado, a presença de células portadoras de MN sem RONS, neste estudo, indica que o azocorante não influencia apenas regiões associadas a sítios de DNAr, sugerindo que existam outros sítios não específicos de ação desse químico.

Verificou-se, adicionalmente, uma grande variação no número de nucléolos das células meristemáticas de *A. cepa*, bem como uma variação no tamanho desses nucléolos dentro de uma mesma célula e entre as células (Tabelas 5 a 7; Figura 6). De acordo com Arkhipchuk et al. (2000), a variação no número de nucléolos em plantas é decorrente da ação de agentes genotóxicos. O presente estudo mostrou uma grande variação na quantidade de nucléolos das células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às concentrações do azocorante, e demonstrou que somente os testes controle positivo e com o azocorante foram capazes de induzir a formação de células com mais de 6 nucléolos, apesar de não ter havido uma relação proporcional de dose-resposta do corante. Dessa maneira, pode-se considerar que a variação do número e do tamanho dos nucléolos (Tabelas 5 a 7; Figura 6) pode estar associada com a ação genotóxica do azocorante BDCP. Os tratamentos de recuperação não parecem ter sido eficientes para minimizar os danos promovidos nos domínios nucleolares por este corante, uma vez que, após os períodos de 48 e 72 horas, ainda foram observadas frequências de células com muitos nucléolos, mostrando um efeito, provavelmente, decorrente de processos de poliploidização celular.

#### D. Bandamento CMA<sub>3</sub>/DAPI

Por meio das análises das lâminas resultantes do bandamento cromossômico CMA<sub>3</sub>/DAPI, verificou-se que as regiões terminais dos cromossomos de *A. cepa* apresentaram

marcação CMA<sub>3</sub> positiva, ou seja, ricas em C-G (Figura 7), corroborando resultados de outros estudos citogenéticos já realizados para essa mesma espécie (KIM et al., 2002).

Pela análise das lâminas submetidas à metodologia de bandamento CMA<sub>3</sub>/DAPI, foi possível observar células portadoras de MN tanto com marcação CMA<sub>3</sub> positiva como sem a referida marcação (Figura 7). A presença de marcações CMA<sub>3</sub> positivas nos MNs de células meristemáticas de *A. cepa* indica que estes MNs são derivados de material genético que apresentam porções terminais dos cromossomos, regiões estas ricas em DNA satélite constituído de repetições C-G. Já os MNs que não apresentaram marcações CMA<sub>3</sub> devem ser resultantes de quebras ocorridas em duas regiões dos cromossomos, pois são portadores de regiões mais intercalares dos cromossomos. Estes dados reforçam a afirmação de que este azocorante BDCP apresenta, tanto ação aneugênica com ação clastogênica sobre as células de *A. cepa*.

As pontes cromossômicas, observadas por meio das análises das lâminas de bandamento CMA<sub>3</sub>/DAPI, confirmam que a maioria destas pontes não apresenta regiões teloméricas, já que não se mostraram reativas ao fluorocromo CMA<sub>3</sub> (Figura 7). Este resultado mostra que as pontes cromossômicas podem ser decorrentes de terminações cromossômicas coesivas ou rearranjos estruturais, conforme citado por Fiskesjö (1993) ou de aderências cromossômicas (GIACOMELLI, 1999) em fases anteriores, corroborando os resultados dos ensaios de bandamento C anteriormente apresentados. Estes dados comprovam ainda mais a ação genotóxica (aneugênica) e mutagênica (clastogênica) para o azocorante BDCP, corroborando as citações de Umbuzeiro et al. (2005) e Caritá e Marin-Morales (2008) para este químico.

#### E. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica que permite a localização de seqüências específicas do DNA em cromossomos metafásicos e no núcleo interfásico (MALUSZYNSKA; HESLAP-HARRISON, 1993). Dentre as diferentes seqüências de DNA repetitivo, usadas na técnica de hibridação *in situ*, a seqüência DNAr 45S é uma das mais empregadas, por ser altamente conservada entre os organismos (GARNATJE et al., 2004).

Pela análise das lâminas submetidas à metodologia de FISH, para todos os testes e tratamentos realizados, foi observada a presença de núcleos interfásicos com várias marcações

espalhadas pelo núcleo (Figura 8). Nas anáfases e telófases dos testes controle negativo, realizados neste trabalho com a espécie *A. cepa*, foi observada a presença de uma mesma quantidade de sinais para os diferentes pólos das células mitóticas.

Dentre as alterações celulares registradas para a metodologia de coloração convencional e de bandamentos cromossômicos, resultantes da ação das diferentes concentrações e tratamentos com o corante comercial BDCP, algumas delas puderam ser melhor avaliadas, após a aplicação da metodologia de FISH usando a sonda de DNAr 45S, como os MNs, as perdas cromossômicas e as telófases com distribuição cromossômica desbalanceada. Dentre os MNs, pode-se observar que houve uma variação na sua constituição, onde alguns apresentaram vários sinais pequenos, enquanto outros, não apresentaram nenhum sinal (Figura 8). A detecção de vários sinais pequenos em alguns MNs mostra que o azocorante pode agir diretamente em regiões altamente conservadas do material genético, por hibridarem com as sondas de DNAr 45S usadas no presente estudo. Os referidos sinais visualizados nesses micronúcleos podem ser associados às porções terminais dos cromossomos, uma vez que alguns estudos mostraram, por FISH, que seqüências de DNAr em *A. cepa* se localizam exatamente nessas regiões cromossômicas (SCHUBERT; WOBUS, 1985; PICH et al., 1996). No entanto, este composto químico também induziu a formação de micronúcleos sem sinais de hibridação, o que sugere que os sítios-alvos de ação do azocorante podem ser variados e inespecíficos.

Foram observadas perdas cromossômicas na metáfase, sendo que algumas delas tinham fortes sinais e outras não. A ausência ou presença de seqüências de DNAr 45S em cromossomos perdidos na metáfase pode levar a uma instabilidade fisiológica das células de *A. cepa*, levando-as, até mesmo, à morte.

Entre as telófases analisadas pela técnica de FISH, foi possível verificar que algumas delas apresentavam-se anormais, por terem sinais nos cromossomos de um único pólo da célula (Figura 8). A presença de sinais de hibridação nos cromossomos de apenas um dos pólos da célula telofásica demonstrou um desbalanço na distribuição dos cromossomos, que pode culminar em alterações numéricas, como indução de células poliplóides e/ou aneuplóides (Figura 8), corroborando estudos realizados por Osuji et al. (1998), Tel-zur et al. (2004) e Vaio et al. (2005), que indicaram a possível associação do número de sítios de DNAr 45S com o nível de ploidia em algumas espécies de plantas.



Estudos adicionais, usando outras sondas de DNA em *A. cepa*, poderão ser realizados para que mais detalhes possam ser esclarecidos sobre os mecanismos de ação do azocorante BDCP.

## **CONCLUSÕES**

Considerando todos os tipos de alterações celulares abordados neste estudo, pode-se concluir que todas as concentrações testadas do corante comercial BDCP foram citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas para o organismo-teste de *A. cepa*. Os mecanismos de ação do azocorante, ora aneugênico ora clastogênico, mostraram-se intimamente associados aos tipos de anormalidades celulares por ele induzidas.

As diferentes técnicas citogenéticas utilizadas neste estudo mostraram uma eficiente complementaridade no fornecimento de informações com relação aos diferentes mecanismos de ação do azocorante BDCP. As técnicas de bandamentos cromossômicos e de hibridação *in situ* fluorescente trouxeram informações adicionais sobre o modo de ação do corante, observado pelas variações no número de nucléolos, além de permitirem também a detecção de sítios cromossômicos relacionados com eventos de quebras e perdas, mostrando a importância da sua associação com a técnica de citogenética convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares). Sendo assim, estas técnicas são indicadas como métodos adicionais para análises de genotoxicidade e mutagenicidade induzidas por contaminantes ambientais.

Apesar dos tratamentos de recuperação terem reduzido as frequências de danos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em quase todos os ensaios realizados, os efeitos provocados pelo corante não foram totalmente eliminados, após a normalização das condições de exposição do organismo teste.

Pelos resultados obtidos, podemos concluir que as associações de diferentes metodologias citogenéticas podem fornecer um esclarecimento substancial sobre os modos de ação de poluentes ambientais, além de serem úteis para futuros estudos realizados com outros corantes têxteis ou até mesmo outros químicos potencialmente danosos para o ambiente.

## **AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem à Professora Gisela de Aragão Umbuzeiro, da UNICAMP, pelo fornecimento do corante comercial BDCP usado neste estudo.

**Tabela 1.** Índices Mitóticos (I.M.) observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial BDCP, ao teste controle negativo (água ultrapura) e controle positivo (MMS), antes e após tratamento de recuperação.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do corante comercial preto ( $\mu\text{g/L}$ )			
			1	10	100	
20 horas	24,450 (0,009)	20,130 (0,009)	19,670 (0,010)	20,550 (0,009)	18,400 (0,011)	19,760 (0,010)
Recuperação-48h	25,850 (0,014)	19,650 (0,009)	20,170 (0,012)	21,750 (0,015)	21,290 (0,011)	20,950 (0,009)
Recuperação-72h	17,210 (0,013)	13,570 (0,013)	15,690 (0,015)	16,470 (0,015)	17,950 (0,010)	15,310 (0,015)

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo.

10.000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão)

Os resultados não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 2.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de 20 horas.

	CN	CP	Concentrações do corante comercial preto (µg/L)			
			1	10	100	1000
<b>ACN</b>						
Perdas de material genético	0,040 (0,011)	1,090 (0,013) <sup>a</sup>	0,880 (0,023)	0,860 (0,021)	0,980 (0,019)	1,430 (0,021) <sup>a</sup>
Perdas cromossômicas	0,040 (0,011)	0,500 (0,021)	0,480 (0,017)	0,630 (0,018) <sup>a</sup>	0,910 (0,026) <sup>a</sup>	0,940 (0,013) <sup>a</sup>
Aderências cromossômicas	0,050 (0,012)	0,660 (0,024) <sup>a</sup>	0,640 (0,019) <sup>a</sup>	0,760 (0,010) <sup>a</sup>	0,580 (0,014) <sup>a</sup>	0,550 (0,014) <sup>a</sup>
Brotos nucleares	0	0	0	0	0	0
C-metáfases	0,100 (0,016)	0,090 (0,016)	0,130 (0,015)	0,180 (0,016)	0,290 (0,018)	0,350 (0,016)
Metáfases poliplóides	0	0,010 (0,000)	0,030 (0,001)	0,050 (0,001)	0,040 (0,001)	0,120 (0,002)
Interfases poliplóides	0	0,040 (0,001)	0,030 (0,001)	0,060 (0,002)	0,060 (0,002)	0,130 (0,003)
Pontes cromossômicas	0,020 (0,008)	0,170 (0,019)	0,240 (0,014)	0,380 (0,016) <sup>a</sup>	0,310 (0,021)	0,160 (0,012)
Multipolaridades	0	0,070 (0,002)	0,050 (0,001)	0,230 (0,010)	0,240 (0,010)	0,250 (0,011)
Total de ACN	0,250 (0,017)	2,630 (0,012) <sup>a</sup>	2,480 (0,015) <sup>a</sup>	3,150 (0,026) <sup>a</sup>	3,410 (0,020) <sup>a</sup>	3,930 (0,021) <sup>a</sup>
<b>MN/Q</b>						
Micronúcleos	0,290 (0,013)	2,010 (0,014) <sup>a</sup>	1,570 (0,017) <sup>a</sup>	1,390 (0,013) <sup>a</sup>	1,230 (0,017)	1,610 (0,014) <sup>a</sup>
Quebras Cromossômicas	0,050 (0,014)	0,690 (0,025) <sup>a</sup>	0,310 (0,016)	0,190 (0,014)	0,560 (0,020) <sup>a</sup>	0,390 (0,019) <sup>a</sup>
Total de MN/Q	0,340 (0,013)	2,700 (0,014) <sup>a</sup>	1,880 (0,017) <sup>a</sup>	1,580 (0,013) <sup>a</sup>	1,790 (0,017) <sup>a</sup>	2,000 (0,014) <sup>a</sup>
<b>AP/NE</b>						
Células em apoptose	0	0	0,010 (0,004)	0	0	0,190 (0,012) <sup>a</sup>
Células em necrose	0	1,370 (0,023) <sup>a</sup>	1,030 (0,020) <sup>a</sup>	1,150 (0,021) <sup>a</sup>	2,730 (0,035) <sup>a</sup>	1,850 (0,024) <sup>a</sup>
Total de AP/NE	0	1,370 (0,023) <sup>a</sup>	1,040 (0,022) <sup>a</sup>	1,150 (0,021) <sup>a</sup>	2,730 (0,035) <sup>a</sup>	2,040 (0,033) <sup>a</sup>
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	0,590 (0,011)	6,70 (0,011) <sup>a</sup>	5,40 (0,018)	5,88 (0,012) <sup>a</sup>	7,93 (0,014) <sup>a</sup>	7,97 (0,021) <sup>a</sup>

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo.

10000 células analisadas por concentração e por controle. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup>Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 3.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 48 horas.

	CN	CP	Concentrações do corante comercial preto (µg/L)			
			1	10	100	1000
<b>ACN</b>						
Perdas de material genético	0,190 (0,021)	1,200 (0,011)	0,390 (0,014)	0,380 (0,017)	0,320 (0,016)	0,320 (0,012)
Perdas cromossômicas	0,090 (0,017)	1,030 (0,013) <sup>a</sup>	1,000 (0,016) <sup>a</sup>	0,600 (0,026)	0,430 (0,020)	0,880 (0,020) <sup>a</sup>
Aderências cromossômicas	0,170 (0,014)	0,540 (0,022)	0,660 (0,018)	0,780 (0,028) <sup>a</sup>	0,730 (0,017) <sup>a</sup>	0,650 (0,013)
Brotos nucleares	0	0	0	0,110 (0,000)	0	0
C-metáfases	0,120 (0,016)	0,380 (0,012) <sup>a</sup>	0,390 (0,021) <sup>a</sup>	0,260 (0,022)	0,220 (0,021)	0,330 (0,018)
Metáfases Poliploídes	0	0,080 (0,012)	0,130 (0,014)	0,080 (0,013)	0,100 (0,017)	0,090 (0,019)
Intérfaces Poliploídes	0	0,100 (0,023)	0,160 (0,017)	0,140 (0,022)	0,150 (0,021)	0,140 (0,017)
Pontes cromossômicas	0,030 (0,010)	0,270 (0,011)	0,260 (0,021)	0,550 (0,029) <sup>a</sup>	0,410 (0,015) <sup>a</sup>	0,320 (0,016) <sup>a</sup>
Multipolaridades	0,050 (0,013)	0,060 (0,019)	0,120 (0,022)	0,180 (0,033)	0,210 (0,031)	0,140 (0,025)
Total de ACN	0,650 (0,019)	3,660 (0,012) <sup>a</sup>	3,110 (0,012) <sup>a</sup>	3,080 (0,019) <sup>a</sup>	2,570 (0,013)	2,870 (0,011) <sup>ab</sup>
<b>MN/Q</b>						
Micronúcleos	0,440 (0,023)	1,730 (0,011) <sup>a</sup>	1,260 (0,019)	0,760 (0,023)	1,660 (0,030) <sup>a</sup>	1,470 (0,017) <sup>a</sup>
Quebras Cromossômicas	0,010 (0,008)	0,330 (0,009) <sup>a</sup>	0,270 (0,023) <sup>a</sup>	0,200 (0,026)	0,160 (0,031)	0,170 (0,022)
Total de MN/Q	0,450 (0,025)	2,060 (0,018) <sup>a</sup>	1,530 (0,028)	0,960 (0,027)	1,820 (0,037) <sup>a</sup>	1,640 (0,029) <sup>a</sup>
<b>AP/NE</b>						
Células em apoptose	0	0	0	0	0	0 <sup>b</sup>
Células em necrose	0	0,040 (0,023) <sup>b</sup>	0,020 (0,011) <sup>b</sup>	0,010 (0,015) <sup>b</sup>	0,030 (0,026) <sup>b</sup>	0,800 (0,029) <sup>ab</sup>
Total de AP/NE	0	0,040 (0,013) <sup>b</sup>	0,020 (0,005) <sup>b</sup>	0,010 (0,005) <sup>b</sup>	0,030 (0,009) <sup>b</sup>	0,800 (0,024) <sup>ab</sup>
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	<b>1,100 (0,025)</b>	<b>5,760 (0,017)<sup>a</sup></b>	<b>4,660 (0,014)</b>	<b>4,050 (0,011)</b>	<b>4,420 (0,013)</b>	<b>5,310 (0,017)</b>

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo.

10000 células analisadas por concentração e por controle. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup>Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup>Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 4.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 72 horas.

	CN	CP	Concentrações do corante comercial preto (µg/L)			
			1	10	100	1000
<b>ACN</b>						
Perdas de material genético	0,040 (0,015)	0,740 (0,016)	0,220 (0,020) <sup>b</sup>	0,310 (0,023)	0,330 (0,018)	0,390 (0,026)
Perdas cromossômicas	0,110 (0,016)	0,420 (0,033)	0,400 (0,019)	0,570 (0,027)	0,400 (0,023)	0,520 (0,036) <sup>b</sup>
Aderências cromossômicas	0,100 (0,014)	0,150 (0,023) <sup>b</sup>	0,380 (0,025)	1,030 (0,029) <sup>a</sup>	0,360 (0,016)	0,400 (0,030)
Brotos nucleares	0	0	0	0	0	0
C-metáfases	0,050 (0,027)	0,130 (0,019)	0,160 (0,022)	0,190 (0,024)	0,090 (0,015)	0,280 (0,025)
Poliploidias (metáfase)	0	0,220 (0,034)	0,010 (0,029)	0,020 (0,012)	0,090 (0,019)	0,050 (0,021)
Poliploidias (intérfase)	0,010 (0,012)	0,240 (0,025)	0,040 (0,022)	0,080 (0,028)	0,110 (0,034)	0,120 (0,022)
Pontes cromossômicas	0,010 (0,024)	0,190 (0,025)	0,110 (0,036)	0,180 (0,023)	0,200 (0,055)	0,080 (0,013)
Multipolaridades	0,010 (0,027)	0,050 (0,051)	0,090 (0,042)	0,040 (0,016)	0,090 (0,035)	0,070 (0,032)
Total de ACN	0,330 (0,020)	2,140 (0,021) <sup>a</sup>	1,410 (0,021) <sup>b</sup>	2,420 (0,020) <sup>a</sup>	1,670 (0,017) <sup>a</sup>	1,910 (0,019) <sup>ab</sup>
<b>MN/Q</b>						
Micronúcleos	0,440 (0,027)	1,350 (0,036) <sup>b</sup>	0,730 (0,027) <sup>b</sup>	0,520 (0,031) <sup>b</sup>	0,860 (0,023) <sup>b</sup>	0,550 (0,029) <sup>b</sup>
Quebras Cromossômicas	0,010 (0,003)	0,160 (0,021) <sup>b</sup>	0,080 (0,013) <sup>b</sup>	0,060 (0,014) <sup>b</sup>	0,120 (0,004) <sup>b</sup>	0,040 (0,007) <sup>b</sup>
Total de MN/Q	0,450 (0,027)	1,510 (0,036) <sup>b</sup>	0,810 (0,027) <sup>b</sup>	0,580 (0,031) <sup>b</sup>	0,980 (0,024) <sup>b</sup>	0,590 (0,030) <sup>b</sup>
<b>AP/NE</b>						
Células em apoptose	0	0	0,110 (0,014) <sup>b</sup>	0,040 (0,026)	0	0,010 (0,019) <sup>b</sup>
Células em necrose	0,070 (0,023)	0,120 (0,021) <sup>b</sup>	0,100 (0,023)	0,200 (0,018) <sup>b</sup>	0,610 (0,022) <sup>ab</sup>	0,640 (0,026) <sup>ab</sup>
Total de AP/NE	0,070 (0,023)	0,120 (0,021) <sup>b</sup>	0,210 (0,013) <sup>b</sup>	0,240 (0,019) <sup>b</sup>	0,610 (0,022) <sup>ab</sup>	0,650 (0,029) <sup>ab</sup>
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	<b>0,850 (0,021)</b>	<b>3,770 (0,037)<sup>ab</sup></b>	<b>2,430 (0,018)<sup>b</sup></b>	<b>3,240 (0,023)<sup>b</sup></b>	<b>3,260 (0,029)<sup>b</sup></b>	<b>3,150 (0,040)<sup>b</sup></b>

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo.

10000 células analisadas por concentração e por controle. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup>Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup>Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 5.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de 20 horas.

Nº de nucléolos por célula	CN	CP	Concentrações do corante comercial preto (µg/L)			
			1	10	100	1000
1	8,810 (0,042)	10,070 (0,042)	11,960 (0,035)	7,190 (0,024)	18,430 (0,061)	10,240 (0,040)
2	47,560 (0,038)	47,030 (0,034)	56,300 (0,031)	32,710 (0,022)	39,390 (0,049)	43,680 (0,032)
3	40,470 (0,056)	34,480 (0,030)	27,860 (0,045)	43,550 (0,027)	34,300 (0,044)	36,480 (0,038)
4	2,450 (0,061)	7,250 (0,090)	3,480 (0,098)	14,180 (0,127)	6,570 (0,058)	7,380 (0,066)
5	0,720 (0,027)	0,940 (0,046)	0,350 (0,029)	2,060 (0,037)	1,190 (0,031)	1,570 (0,051)
6	0	0,160 (0,021)	0,060 (0,019)	0,160 (0,029)	0,110 (0,034)	0,530 (0,036) <sup>a</sup>
7	0	0,070 (0,001)	0	0,110 (0,000)	0	0,120 (0,003)
8	0	0	0	0,040 (0,001)	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo.

5000 células analisadas por concentração e por controle. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup>Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 6.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 48 horas.

Nº de nucléolos por célula	Concentrações do corante comercial preto (µg/L)					
	CN	CP	1	10	100	1000
1	8,360 (0,045)	11,430 (0,032)	8,050 (0,030)	9,790 (0,028)	6,580 (0,036)	10,290 (0,043)
2	38,410 (0,029)	44,920 (0,038)	37,130 (0,026)	37,580 (0,031)	24,980 (0,026)	38,130 (0,039)
3	37,770 (0,040)	26,020 (0,051)	43,790 (0,021)	35,430 (0,036)	43,060 (0,022)	39,140 (0,046)
4	14,780 (0,099) <sup>b</sup>	11,890 (0,202)	9,530 (0,060)	10,440 (0,090)	22,150 (0,051) <sup>b</sup>	11,320 (0,082)
5	0,680 (0,198)	4,960 (0,040)	0,980 (0,038)	4,940 (0,036) <sup>ab</sup>	2,990 (0,024) <sup>ab</sup>	0,690 (0,027)
6	0	0,780 (0,032) <sup>a</sup>	0,340 (0,011) <sup>ab</sup>	1,780 (0,022) <sup>a</sup>	0,230 (0,005)	0,300 (0,033)
7	0	0	0,170 (0,011)	0	0	0,130 (0,024)
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0,040 (0,000)	0	0

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo.

5000 células analisadas por concentração e por controle. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup>Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup>Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.



**Tabela 7.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 72 horas.

Nº de nucléolos por célula	CN	CP	Concentrações do corante comercial preto (µg/L)			
			1	10	100	1000
1	13,390 (0,028)	16,150 (0,030)	12,670 (0,029)	9,830 (0,025)	15,200 (0,026)	13,620 (0,024)
2	41,630 (0,023)	37,610 (0,024)	42,820 (0,028)	26,260 (0,028)	29,350 (0,021)	30,270 (0,023)
3	37,640 (0,029)	38,030 (0,025)	36,650 (0,026)	41,190 (0,020)	36,360 (0,024)	33,710 (0,020)
4	6,120 (0,075)	7,040 (0,045)	6,170 (0,042)	20,170 (0,027) <sup>a</sup>	17,140 (0,032) <sup>ab</sup>	19,760 (0,022) <sup>ab</sup>
5	1,170 (0,031)	0,850 (0,044)	1,500 (0,032) <sup>b</sup>	2,260 (0,061)	1,730 (0,045)	2,090 (0,024)
6	0,050 (0,019)	0,320 (0,021)	0,110 (0,019)	0,190 (0,029)	0,170 (0,034)	0,430 (0,035)
7	0	0	0,080 (0,002)	0,040 (0,016)	0,050 (0,013)	0,120 (0,001)
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0,060 (0,000)	0	0

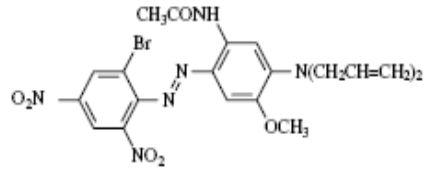
**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo.

5000 células analisadas por concentração e por controle. Média (Desvio-padrão).

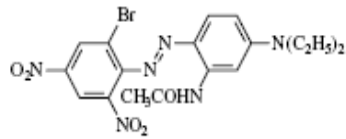
<sup>a</sup>Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup>Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

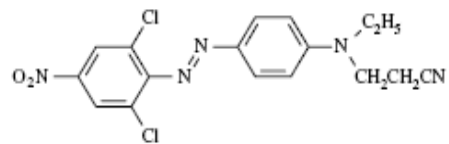
**Blue Component of BDCP (C.I. Disperse Blue 373)**



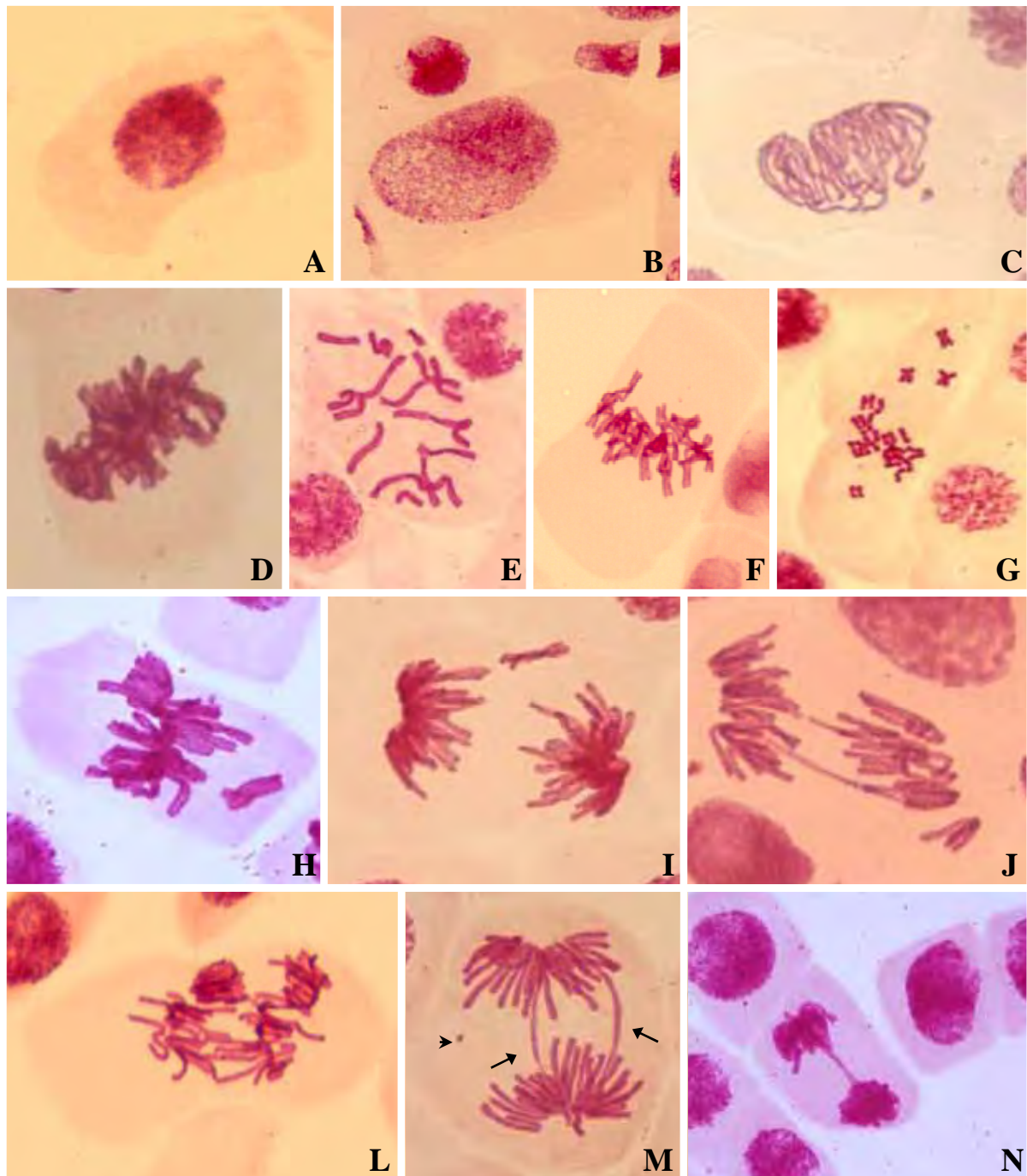
**Violet Component of BDCP (C.I. Disperse Violet 93)**



**Orange component of BDCP (C.I. Disperse Orange 37)**

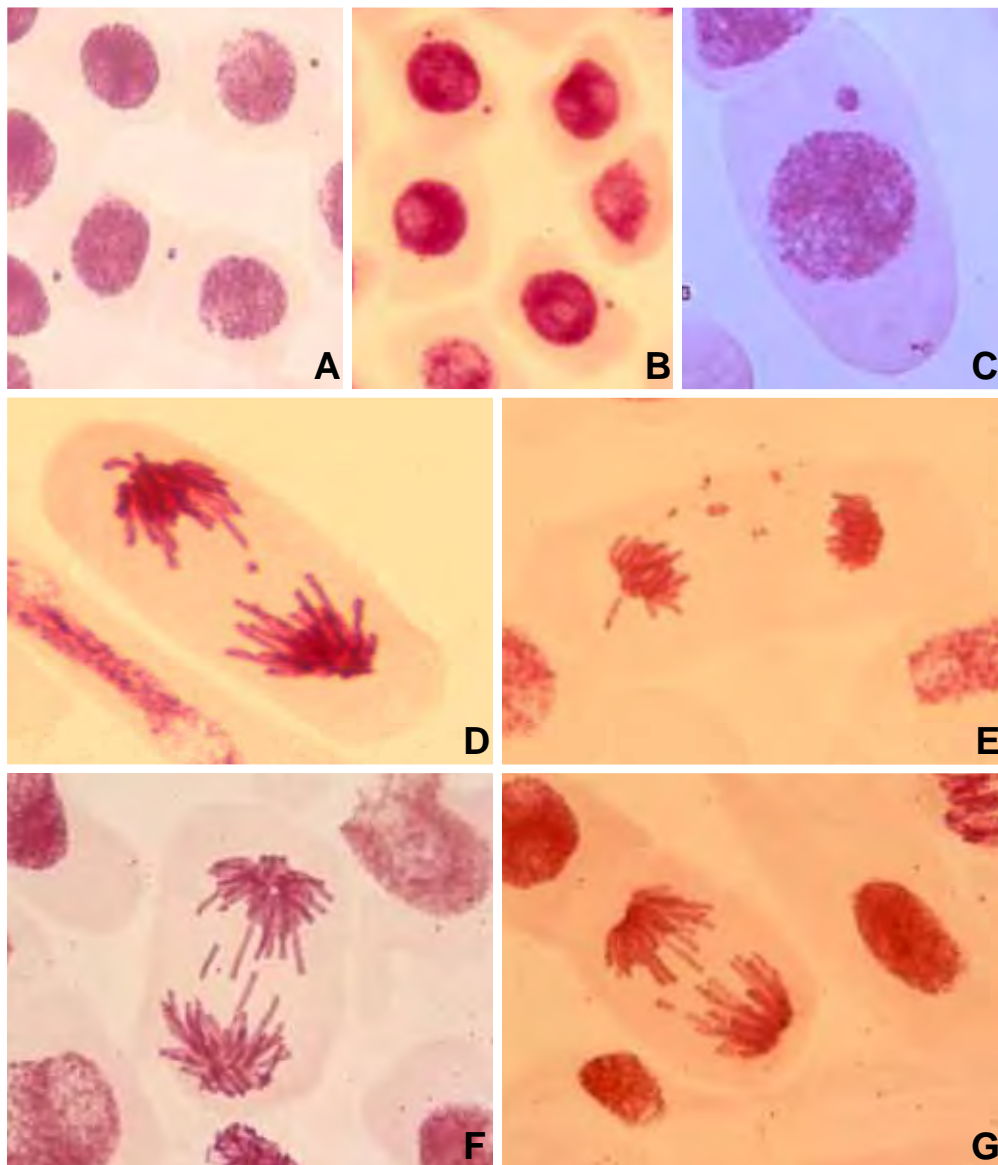


**Figura 1.** Estruturas químicas dos componentes do corante comercial preto (UMBUZEIRO et al., 2005).



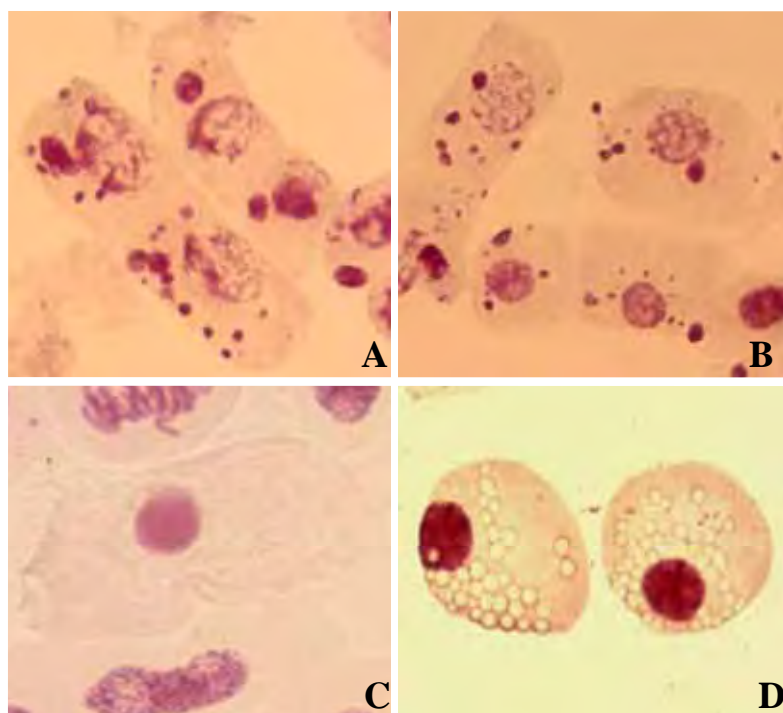
**Figura 2. Danos genotóxicos observados nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* tratadas com o corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product).**

**A.** Broto nuclear; **B.** Núcleo interfásico poliplóide; **C.** Perda de material genético na prófase; **D.** Aderência cromossômica; **E-G.** C-metáfases; **H-J.** Perdas cromossômicas; **L.** Anáfase multipolar; **M.** Pontes cromossômicas (seta) e fragmento cromossômico (ponta de seta); **N.** Ponte cromossômica.

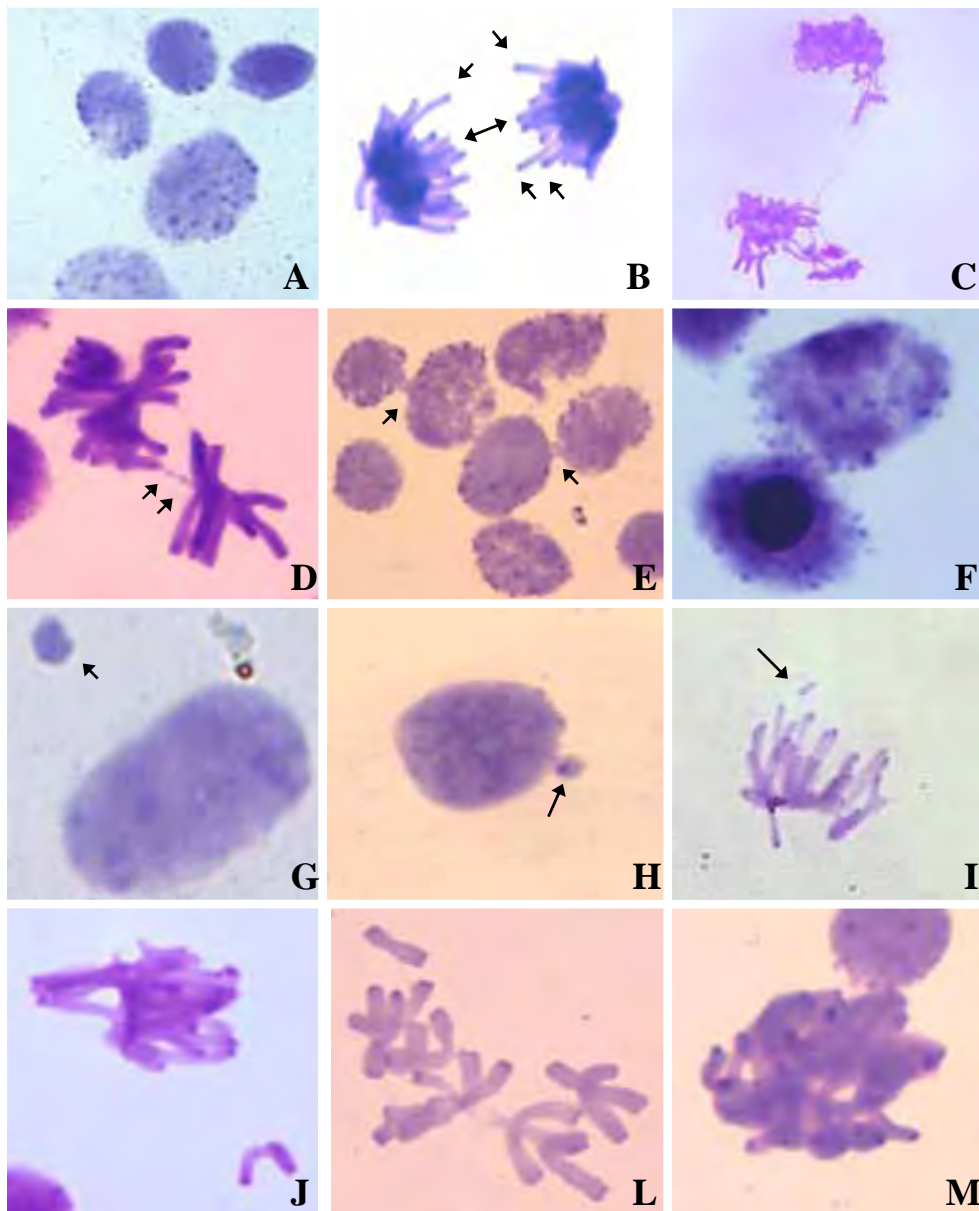


**Figura 3. Danos mutagênicos observados nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* tratadas com o corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product).**

**A-B.** micronúcleos pequenos (provavelmente derivados de efeitos clastogênicos); **C.** micronúcleo grande (provavelmente derivados de efeitos aneugênicos); **D-G.** anáfases com fragmentos cromossômicos em número e tamanhos variados: **D-E.** Células portadoras de pequenos fragmentos cromossômicos e **F-G.** Células com fragmentos cromossômicos grandes.

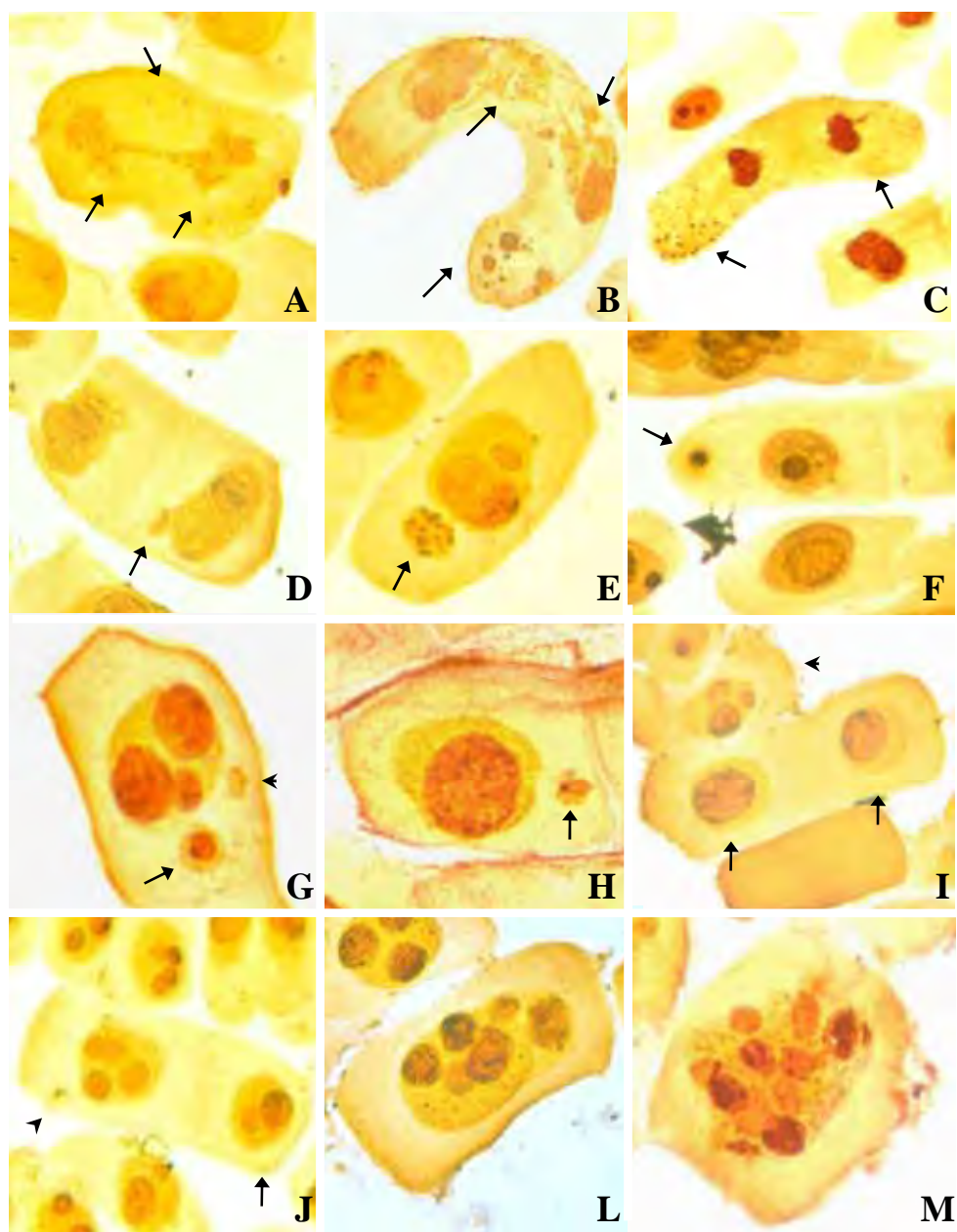


**Figura 4. Danos citotóxicos observados nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* tratadas com o corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product). A-B. células em apoptose; C-D. células em necrose.**



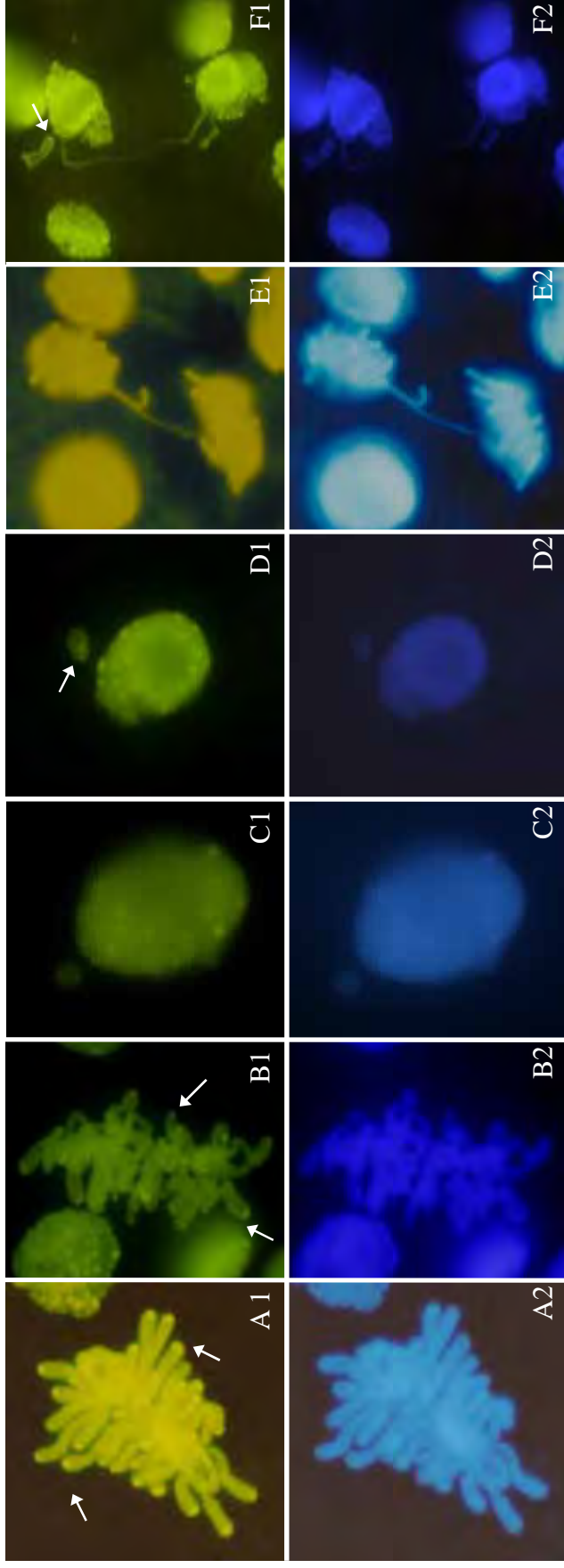
**Figura 5. Células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com o corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product) e submetidas à metodologia de Bandeamento C.**

**A.** Núcleos interfásicos com marcações C-positivas ; **B.** Anáfase com marcações C-positivas em regiões teloméricas (setas); **C e D.** Anáfases com pontes cromossômicas: **C.** sem marcações C-positivas e **D.** com marcações C-positivas (setas); **E.** Núcleos interfásicos com pontes (setas); **F.** Célula portadora de núcleo com cromatina totalmente condensada; **G e H.** Células portadoras de micronúcleo: **G.** sem marcação C-positiva e **H.** com marcação C-positiva (seta); **I.** Fragmento cromossômico com marcação C-positiva (seta); **J.** Metáfase com perda cromossômica, apresentando marcações C-positivas em regiões teloméricas; **L.** C-metáfase mostrando marcações C-positivas em regiões teloméricas; **M.** Metáfase com aderência cromossômica, mostrando marcações nas regiões teloméricas dos cromossomos.



**Figura 6. Células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com o corante têxtil comercial BDCP (Black Dye Commercial Product) e submetidas à metodologia de Bandeamento RON.**

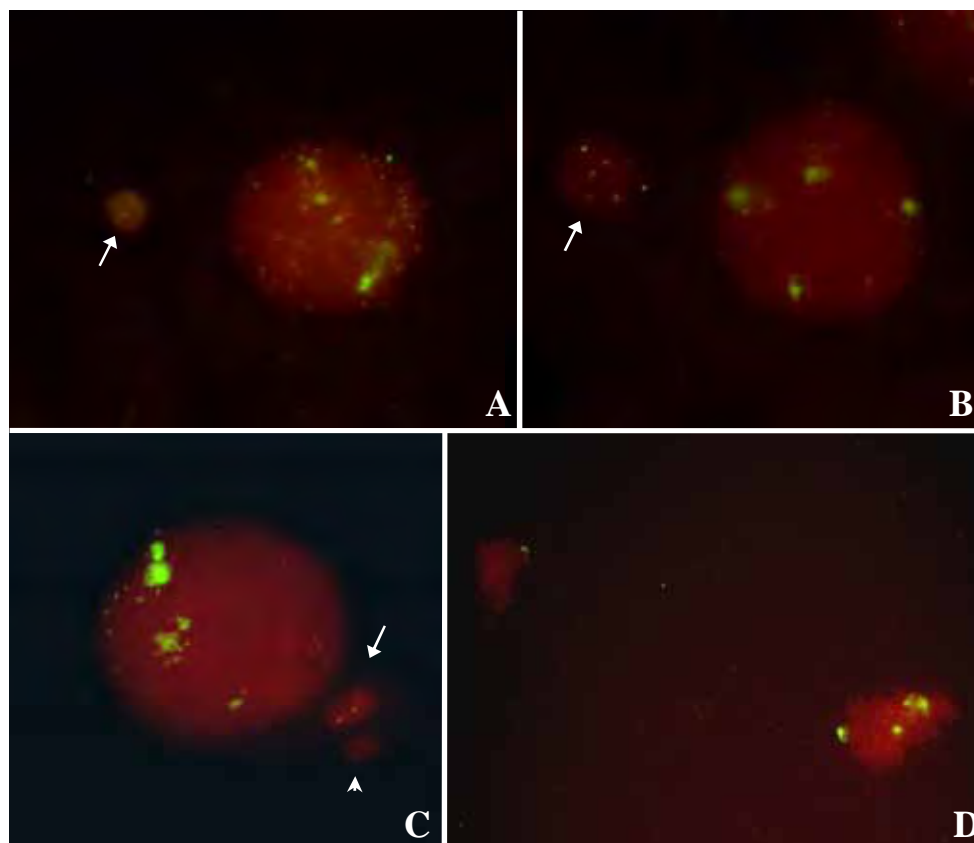
**A-C.** Proteínas ácidas nas células em anáfase (**A e B**) e em telófase (**C**); **D-H.** Micronúcleos (**D.** sem região organizadora de nucléolo; **E.** com proteínas ácidas; **F. e H.** com região organizadora de nucléolo; **G.** com região organizadora de nucléolo (seta) e sem região organizadora de nucléolo (cabeça de seta) ); **I-M.** Variação no número de nucléolos (**I.** Células com um nucléolo (setas) e com três nucléolos (cabeça de seta); **J.** Células com dois nucléolos (seta) e com quatro nucléolos (cabeça de seta); **L.** Célula com seis nucléolos; **M.** Célula com dez nucléolos.



**Figura 7. Células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com o corante comercial BDCCP (Black Dye Commercial Product) e submetidas à metodologia de Bandejamento por fluorocromos base-específicos CMA<sub>3</sub>/DAPI.**

**A-B.** Metáfases mostrando marcação CMA<sub>3</sub> positiva nos telômeros (setas); **C.** Micronúcleo sem marcação CMA<sub>3</sub>; **D.** Micronúcleo com marcação CMA<sub>3</sub> positiva (seta); **E.** Anáfase com ponte cromossômica sem marcação CMA<sub>3</sub>; **F.** Telófase com ponte cromossômica sem marcação CMA<sub>3</sub> e com perda cromossômica mostrando marcação CMA<sub>3</sub> positiva (seta).  
(1-CMA<sub>3</sub>; 2-DAPI) .





**Figura 8.** Células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com o corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product) e submetidas à Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), usando sonda de rDNA 45S.

**A-B.** Micronúcleos com vários sinais pequenos de hibridação (setas); **C.** Micronúcleos com sinais (seta) e sem sinal de hibridação (cabeça de seta); **D.** Telófase com número diferente de sinais de hibridação por pólo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES DE LIMA, R.O.; BAZO, A.P.; SAVADORI, D.M.F.; RECH, C.M.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research**, v. 626, p. 53-60, 2007.

AMES, B.N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-364, 1975.

ANTHONY, R.G., HUSSEY, P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytokeleton. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 112-116, 1999.

ARKHIPCHUK, V.V.; MALINOVSKAYA, T.T.; GARANKO, N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuate* cells. **Environmental Toxicology** v. 15, p. 338-344, 2000.

ARLT, V.M.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PAPEL, U.; SORG, B.L.; SCHMEISER, H.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of environmental contaminant 3- nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferases. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1937-1945, 2002.

BARTSCH, H. Metabolic activation of aromatic amines and azo dyes. **International Agency of Research on Cancer**, v. 40, p.13-30, 1981.

BISWAS, S.J., KHUDA-BUKHSH, A.R. Cytotoxic and genotoxic effects of the azo-dye p-dimethylaminoazobenzene in mice: a time-course study. **Mutation Research**, v. 587, p. 1-8, 2005.

BOURGEOIS, C.A. Distribution of mitomycin d-induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA. **Chromosoma: Biology of the Nucleus**, v. 48, p. 203-211, 1974.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R. Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. **Heredity**, v. 53, p. 603-611, 1984.

CHUNG, K.T.; FULK, G.E.; ANDREWS, A.W. Mutagenicity testing of some commonly used dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 641-648, 1981.

CHUNG, K.T.; STEVENS, J.R. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

CIMINO, M.C. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p. 362-390, 2006.

CLARKE, E.A.; ANLIKER, R. Organic dyes and pigments. In: Hutzinger, O., Editor. The handbook of environmental chemistry, v. 3, part. A. **Anthropogenic Compounds**. Estados Unidos: Springer-Verlag, 1980. 215 p.

CLONFERO, E.; VERNIER, P.; GRANELL, N.; LEVIS, A.G. Leather azo dyes: mutagenic and carcinogenic risks. **La Medicina del Lavoro**, v. 81, p. 222-229, 1990.

DE SERRES, F.J. Preface: Higher plants as effective monitors of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 270, p. 1-3, 1992.

DEUMLING, B.; GREILHUBER, J. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. **Chromosoma**, v. 84, p. 535-555, 1982.

EDWARDS, J.C. **Investigation of color removal by chemical oxidation for three reactive textile dyes and spent textile dye wastewater**. 2000. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências Ambientais) – Departamento de Engenharia Ambiental e Civil, Universidade do Estado da Virginia, Blackburg, 2000.

ELHAJOUJI, A.; CUNHA, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. **Mutagenesis**, v. 13, p. 193-198, 1998.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2005. 212 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent –Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, New York, v. 8, p. 461-470, 1993.

FREEMAN, H.S.; ESANCY, J.V.; CLAXTON, L.D. An approach to the design of non mutagenic azo dyes: analogs of the mutagen CI Direct Black 17. **Dyes and Pigments**, v. 13, p. 5-77. 1990.

GARG, A.; BHAT, K.L.; BOCK, C.W. Mutagenicity of aminoazobenzene dyes and related structures; a QSAR/QPAR investigation. **Dyes and Pigments**, v. 55, p. 35-52, 2002.

GARNATJE, T., VALLÈS, J., VILATERSANA, R., GARCIA-JACAS, N., SUSANNA, A., SILJAK-YAKOVLEV, S. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). **Plant Biology**, v. 6, p. 140-146, 2004.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul**. 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 1999.

GORDON, P.F.; GREGORY, P. **Organic Chemistry in Colour**. 1 ed. New York: Springer-Verlag, 1983, 322 p.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, v. 281, p. 89-92, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations. **Mutation Research**, v. 426, p. 107-112, 1999.

GRIFFITHS, J. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed., Oxford, 1984, p. 30.

GUARATINI, C.C.I; ZANONI, M.V.B. Textile Dyes. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.

GUPTA, P.; SHARMA, T. Non-random distribution of aberrations and identification with C and G-banding of the position of breakage points on Muntjac chromosomes induced by Mitomycin C, Bromodeoxyuridine and Hydroxylamine. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 81, p. 63-74, 1981.

HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I.-L.; KNUDSEN, L.E.; LINDHOLM, C.; NORPPA, H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: result from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**, v. 64, p. 2258-2263, 2004.

HAO, O.J.; KIM, H.; CHIANG P-C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 449-505, 2000.

HATCH, F.T.; BODNER, A.J.; MAZRINAS, J.A.; MOORE, D.H. Satellite DNA and cytogenetic evolution. DNA quality, satellite DNA and karyotic variations in kangaroo rats. **Chromosome**, v. 58, p. 155-168, 1976.

HIZUME, M.; SATO, S.; TANAKA, A. A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. **Stain Technology**, v. 55, v. 87-90, 1980.

HOLME, I. Ecological aspects of color chemistry. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed. Oxford: Society of Chemistry Industry, 1984, 128 p.

KAINA, B. The action of N-methyl-N-nitrosourea on non-established human cell lines *in vitro*. II. Non-random distribution of chromatid aberrations in diploid and Down's cell. **Mutation Research**, v. 43, p. 401-413, 1977.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, v. 62, p. 64-74, 2001.

KIHLMAN, B.A. **Actions of chemical on dividing cells**. 1 ed. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1966, 88 p.

KIM, E.S.; PUNINA, E.O.; RODIONOV, A.V. Chromosome CPD (PI/DAPI) – and CMA/DAPI – Banding Patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, p. 392-398, 2002.

KRISCH-VOLDERS, M.; VANDHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 25, p.78, 2002.

LEME, D.M; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p.214-219, 2008.

MA, T.H.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MALUSZYNKA, J.; HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular cytogenetics of the genus *arabidopsis*: *In situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. **Annals of Botany**, v. 71, p. 479-484, 1993.

MARCANO, L.; DEL CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo em poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. tratadas com inhibidores metabólicos. **Ciências**, v. 3, p. 73-82, 1995.

MARCANO, L; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

MARTINS, C.; GALETTI, P.M. Chromosomal Localization of 5S rDNA Genes in Leporinus Fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p. 363-367, 1999.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MATSUMOTO, S.T., MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential of the water river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**. v. 69, p. 399-408. 2004.

MATSUOKA, A.; TADA, A.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; ÖNFELT, A.; WAKABAYASHI, K. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (azo dyes) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. **Mutation Research**, v. 493, p. 75-85, 2001.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; SMYTH, W.F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 81-87, 2001.

MEDINA, F.J.; CERDIDO, A.; FERNÁNDEZ-GOMES, M.E. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. **Experimental Cell Research**, v. 221, p. 111-125, 1995.

MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.

MICHAELS, G.B.; LEWIS, D.L. Sorption and toxicity of azo and triphenyl methane dyes to aquatic microbial populations. **Environmental Contaminants and Toxicology**, v. 34, p. 323-330, 1985.

MORIELLE, A. **O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular**. 2004. 23f. Monografia (Exame de Qualificação em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2004.

NATARAJAN, A.T.; RAPOSA, T. Heterochromatin and chromosome aberrations. A comparative study of three mouse cell lines with different karyotype and heterochromatin distributions. **Hereditas**, v. 80, p. 83-90, 1975.

NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial Process for the Decolorization of Textile Effluent Containing Azo, Diazo and Reactive Dyes. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 435-442, 1996.

NONY, C.R.; BOWMAN, M.C.; CAIRNS, T.; LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P. Metabolism studies of an azo dye and pigments in the hamster based on analysis of the urine for the potentially carcinogenic aromatic amines. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 4, p. 132-140, 1980.

NUTI RONCHI, V.; BONATTI, S.; TURCHI, G. Preferential localization of chemically induced breaks in heterochromatic regions of *Vicia faba* and *Allium cepa* chromosomes. I. Exogenous thymidine enhances the cytologic effects of 4-epoxyethyl-1,2-epoxy-cyclohexane. **Environmental and Experimental Botany**, v. 26, p. 115-126, 1986.

ODEIGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 126, p. 161-167, 1997.

OLIVEIRA, D.P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais – um estudo de caso**. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v. 626, p. 135-142, 2007.

O'NEILL, C; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; LOURENCO, N.D.; PINHEIRO, H.M.; DELÉE W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1009-1018, 1999.

OSUJI, O.J.; CROUCH, J.; HARRISON, G. HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5,8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. **Annals of Botany**, v. 82, p. 243-248, 1998.

PATHAK, S.; MCGILL, M.; HSU, T.C. Actinomycin D effects on mitosis and chromosomes: sticky chromatids and localized lesions. **Chromosoma**, v. 50, p. 79-88, 1975.

PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, v. 58, p. 179-196, 2003.

PICH, U; FUCHS, J.; SCHUBERT, I. How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? **Chromosome Research**, v. 4, p. 207-213, 1996.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, T. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PRIVAL, M.J.; MITCHELL, V.D. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. **Mutation Research**, v. 97, p. 103-116, 1982.

PROSKURYAKOV, S.Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, v. 283, p. 1-16, 2003.

RAFII, F.; HALL, J.D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 35, p. 897-901, 1997.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 136, p. 13-18, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v. 312, p.17-24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1998.

REEVES, B.R.; MARGOLES, C. Preferential location of chlorambucil-induced breakage in the chromosomes of normal human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 26, p. 205-208, 1974.

ROWLAND, R.E. Chromosome banding and heterochromatin in *Vicia faba*. **Theoretical and Applied Genetics: International Journal of Plant Breeding Research**, v. 60, p. 275-280, 1981.

SCHUBERT, I.; WOBUS, U. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, v. 92, p. 143-148, 1985.

SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant Systematic and Evolution**, v. 134, p. 293-297, 1980.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; TORNAM, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium cepa* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p. 171-179, 1997.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 69-80, 2001.

TEL-ZUR, N.; ABBO, S.; BAR-ZVI, D.; MIZRAHI, Y. Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* Vine Cacti (Cactaceae): Evidence from hybridization and cytological studies. **Annals of Botany**, v. 94, p. 527-534, 2004.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBERIO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4-14, 2007.



UMBUZEIRO, G. Relatório Científico do Workshop Internacional. In: **Novos Paradigmas em Genética Toxicológica: 3ª Sessão: Contaminação da Água**. CETESB, São Paulo, [s.n.]. 1994.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

USEPA, 1994. Disponível em: <<http://www.epa.gov/EPA-ASTE/1994/December/Day-22/pr-98.html>> Acesso em: 03 de maio de 2008.

VAIO, M.; SPERANZA, P.; VALLS, J.F.; GUERRA, M.; MAZZELLA, C. Localization of the 5S and 45S rDNA and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Annals of Botany**, v. 96, p. 191-200, 2005.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008.

VENTURINI, S.; TAMARO, M. Mutagenicity of anthraquinone and azo dyes in Ames *Salmonella typhimurium* test. **Mutation Research**, v. 68, p. 307-312, 1979.

VIEIRA, S. **Bioestatística – Tópicos Avançados, Testes não paramétricos, tabelas de contringência e análise de regressão**. 1 ed., Rio de Janeiro: Editora Campus, 2004, p. 23-27.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to *in vitro* clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, p. 21-26, 2007.

YAMAMOTO, K.I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v. 71, p. 127-131, 1980.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 109-114, 2003.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, p. 3-20, 2002.

ZOLLINGER, H. **Color–Chemistry–Synthesis: Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments**. 1 ed., New York: VCH Publishers, 1987. 310 p.

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DO CORANTE COMERCIAL PRETO EM CÉLULAS DE *Allium cepa* (ASPARAGINALES: ALLIACEAE), ANTES E APÓS TRATAMENTO DE BIODEGRADAÇÃO BACTERIANA”**

**RESUMO**

Foram realizadas avaliações da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de diferentes concentrações (50 e 200 µg/L) de um azocorante usado por indústrias têxteis (BDCP - Black Dye Commercial Product), antes e após tratamento de biodegradação bacteriana, por meio da técnica citogenética de coloração convencional e de bandamento RON em células de *A. cepa*. Foram observadas diferentes aberrações cromossômicas, nucleares e alterações no número de nucléolos das células expostas ao corante, antes e após o tratamento de biodegradação. As frequências significativas de aberrações cromossômicas e nucleares, observadas nos testes com o azocorante biodegradado pelas bactérias, indicam que os metabólitos gerados são mais genotóxicos que o próprio azocorante. As perdas de material genético caracterizaram o tipo de alteração associado, principalmente, à ação do azocorante original, enquanto aderências cromossômicas, brotos nucleares e células binucleadas foram as aberrações, preferencialmente, induzidas pela ação dos metabólitos do corante, pós biodegradação. A redução na frequência total de células alteradas, após tratamentos de recuperação, indicou que o organismo teste *A. cepa* apresenta a possibilidade de se recuperar dos danos induzidos pelo azocorante e pelos seus metabólitos, após normalização das condições de exposição.

*Palavras-chave:* Azocorante, *Allium cepa*, biodegradação microbiana, aberrações cromossômicas, morte celular.

## INTRODUÇÃO

Os corantes sintéticos têm sido bastante utilizados na indústria têxtil, de papel, alimentícia, cosmética, farmacêutica, entre outras, devido ao baixo custo e facilidade de sua síntese, bem como sua excelente capacidade de fixação e ampla variedade de cores (GRIFFITHS, 1984; CHEN et al., 1999). Entre as diferentes classes de corantes sintéticos, os azocorantes são aqueles que apresentam um ou mais grupos azo (-N=N-) associados a um ou mais anéis aromáticos em sua constituição (SO et al., 1990; WONG; YUEN, 1996). Estes corantes têm sido amplamente utilizados, particularmente no setor têxtil (VANDEVIVERE et al., 1998; KUNZ et al., 2002; EDWARDS, 2000).

A poluição causada por efluentes que contêm azocorantes pode provocar alterações em ciclos biológicos, e afetar, principalmente, os processos de fotossíntese, além de causar outros sérios impactos ao meio ambiente (HOUK, 1992; HAO et al., 2000). Organismos expostos aos azocorantes têm apresentado diferentes alterações celulares, como aberrações cromossômicas e células micronucleadas, alterações estas que comprovam os efeitos genotóxicos e mutagênicos do produto (NONY et al., 1980; PATTERSON; BUTLER, 1982; PERCY et al., 1989; RAFII et al., 1997; AL-SABTI, 2000; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). Segundo Umbuzeiro et al. (2005), ensaios realizados com o teste de Ames em *Salmonella typhimurium*, usando amostras de águas de um rio que recebe efluente de indústria têxtil que utiliza o corante Black Dye Commercial Product (BDGP), apontam para uma ação mutagênica do corante. Alves de Lima et al. (2007) mostraram que este corante também foi carcinogênico para ratos. Estudos realizados por diversos autores (CLARKE; ANLIKER, 1980; CHUNG; STEVENS, 1993; KAMMRADT, 2004; UMBUZEIRO et al., 2005, CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008), com águas contaminadas por azocorantes, relatam que este corante apresenta uma potencialidade tóxica, mutagênica e carcinogênica, que pode estar associada tanto aos efeitos do próprio corante como aos efeitos de seus metabólitos.

Segundo Oliveira (2005), têm sido utilizados diferentes métodos para o tratamento de efluentes que contêm azocorantes, na tentativa de minimizar os problemas deste tipo de contaminação. De acordo com Robinson et al. (2001), muitos métodos físicos e químicos são usados para a remoção de corantes têxteis, mas a maioria deles acumula ou concentra esses compostos, podendo, segundo Jadhav et al. (2007) gerar uma poluição secundária, decorrente do uso excessivo destas substâncias químicas.

A biodegradação é um processo de tratamento que usa material biológico para diminuir ou eliminar as substâncias químicas que estão envolvidas com a poluição ambiental. O uso de biodegradação para tratamento de azocorantes é um processo que tem sido indicado como de grande potencial de sucesso, porém há necessidade de estabelecer um tratamento biológico eficiente, considerando quais enzimas são aptas a degradar determinados azocorantes (BANAT et al., 1996; KUNZ et al., 2002; ÖZTÜRK; ABDULLAH, 2006; JADHAV et al., 2007), visto que estes corantes são relativamente resistentes aos processos de degradação biológica (FERREIRA, 1998; MARTINS et al., 2001, 2002, 2003), devido à sua complexa estrutura química e alta estabilidade à luz (HOLME, 1984; PAGGA; BROWN, 1986; SHAUL et al., 1991; KIM; SHODA, 1999). Outro problema a ser vencido com a biodegradação de azocorantes é que, muitas vezes, estes compostos são tóxicos ou inibitórios para os organismos usados na biodegradação, como, por exemplo, para os microorganismos (JEWORSKI; HEINZLE, 2000).

Entre os microorganismos utilizados na degradação de azocorantes, pode-se citar o grupo das bactérias (KUDLICH et al., 1997; ZISSI et al., 1997; HU, 1998; SAIRNAK; KANEKAR, 1999; COUGHLIN et al., 1999; RUSS et al., 2000), tais como as do gênero *Aeromonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Shigella*, *Streptomyces*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Mycobacterium* (PASZCZYNSKI et al., 1991; ZHOU; ZIMMERMAN, 1993; CAO et al., 1993; WONG; YUEN, 1996; CHEN et al., 1999; ORANUSI; OGUGBUE, 2001; MCMULLAN et al., 2001; BHASKAR et al., 2003; JONES et al., 2003).

A metabolização dos azocorantes por bactérias, sob condições anaeróbicas, pode ocorrer por diferentes maneiras: 1. clivagem da ligação azo, catalisada por azoredutases (enzimas citoplasmáticas com baixa especificidade ao substrato) (ROBINSON, et al., 2001, STOLZ, 2001); 2. redução não específica por transportadores de elétrons (reações redox) a partir de vias metabólicas celulares (ex: liberação de flavinas, quinonas, hidroquinonas) (KECK et al., 1997; YOO, 2002; PINHEIRO et al., 2004); 3. ação de compostos inorgânicos reduzidos, como o  $\text{Fe}^{2+}$ , que são formados como produto final de certas reações metabólicas de bactérias estritamente anaeróbicas (STOLZ, 2001; VAN DER ZEE et al., 2001, 2003; YOO, 2002); 4. redução química por radicais sulfil gerados na redução de sais de sulfato (YOO, 2002; PINHEIRO et al., 2004). No entanto, sob condições anaeróbicas, os azocorantes podem originar aminas aromáticas, que são recalcitrantes para as bactérias (ZAOYAN et al., 1992; WEBER; ADAMS, 1995). Estas aminas também se acumulam no meio ambiente e

podem ser tóxicas, mutagênicas e possivelmente carcinogênicas para os animais expostos (KAMMRADT, 2004).

O tratamento bacteriano, em condições aeróbicas, geralmente, é eficiente para mineralizar, totalmente, as aminas aromáticas (BROWN; LABOUREUR, 1983; LOIDL et al., 1990; ANDREAS et al., 1997; ISIK; SPONZA, 2003), apesar de estudos mostrarem que alguns azocorantes são mais resistentes ao ataque bacteriano sob condições de aerobiose (HU, 1998). Oliveira et al. (2007) demonstraram que o corante comercial preto (BDPC) é recalcitrante até mesmo ao tratamento aeróbico, uma vez que foram detectados componentes desse composto em amostras de efluentes tratados, por sistemas de lodo ativado.

Vegetais superiores constituem um importante material para teste das alterações genéticas provocadas por poluentes ambientais, sendo reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas (GRANT, 1994; YI; MENG, 2003). Segundo Ma et al. (1995), o uso de vegetais como organismo-teste tem sido indicado e validado por diversas agências ambientais, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP – United Nations Environmental Program), a Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – United States Environmental Protection Agency). A espécie *Allium cepa* constitui um dos materiais pioneiros nos estudos de aberrações cromossômicas causadas pela ação de agentes físicos e químicos (LEVAN, 1938) e tem sido, até hoje, usada como um eficiente organismo-teste, por apresentar um padrão genético indicado para testes de toxicidade e genotoxicidade, como, por exemplo, os ensaios de aberrações cromossômicas (CONSTANTIN; OWENS, 1982; GRANT, 1982; SHARMA, 1983; FISKEJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; GRANT, 1994; GRANT, 1999; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007, 2009; LEME et al., 2008). Alguns pesquisadores demonstraram uma alta correlação entre os testes realizados com a espécie *A. cepa* e outros organismos-teste. Rank e Nielsen (1994) mostraram uma correlação de 82% entre os testes com *A. cepa* e os ensaios de carcinogenicidade em roedores, demonstrando, ainda, que os ensaios com *A. cepa* foram mais sensíveis que os testes de Ames e de Microscreen. Um estudo realizado por Caritá e Marin-Morales (2008), por meio de aplicação de teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*, mostrou a potencialidade mutagênica para determinadas concentrações de efluentes industriais contaminados pelo azocorante comercial preto (BDPC) e outros poluentes.

O surgimento de novas técnicas de coloração cromossômica, aplicadas, com sucesso, em análise cromossômica de plantas (MUKAI et al., 1992; JIANG et al., 1993; TUNA et al., 2004), acrescenta informações sobre a composição e a disposição de DNA de diferentes constituições ao longo dos cromossomos, possibilitando uma análise mais detalhada da organização estrutural dos cromossomos (ROWLAND, 1981; KIM et al., 2002). A coloração com o nitrato de prata vem sendo utilizada para identificar o número de nucléolos e possíveis sítios ativos da RON em diferentes espécies vegetais (MURRAY et al., 1992; CARVALHO; GUERRA, 2002). A posição das RONS auxilia na melhor compreensão dos eventos de alterações cromossômicas que se estabeleceram em cada cariótipo. Assim, em casos de indução de alterações cromossômicas por agentes genotóxicos, essa técnica poderá oferecer uma sensibilidade pontual, diagnosticando, facilmente, os prováveis sítios de ação e quais as alterações associadas a estes agentes.

Considerando que, de maneira geral, os azocorantes e seus produtos relacionados têm potencialidade de causar sérios danos no material genético dos organismos a eles expostos e que seus mecanismos de ação sobre o DNA necessitam ser melhor investigados, o objetivo do presente estudo foi analisar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do corante comercial preto (BDPC), antes e após o tratamento de biodegradação por um “pool” de bactérias heterotróficas provenientes de uma estação de tratamento biológico de efluentes, usando a técnica citogenética de coloração convencional (teste de aberrações cromossômicas e nucleares) e de bandamento AgRON, em células das raízes de *A. cepa*. Este trabalho também procurou buscar informações sobre a efetividade do processo de biorremediação por bactérias no tratamento de águas contaminadas com este azocorante.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi estudado neste trabalho o corante comercial preto (BDPC - Black Dye Commercial Product), que é um azocorante composto por 3 corantes, pertencentes ao grupo dos nitro-aminoazobenzenos (Umbuzeiro et al., 2005): C.I. Disperse Blue 373 ( $C_{21}H_{21}BrN_6O_6$ ; CAS n° 51868-46-3), C.I. Disperse Violet 93 ( $C_{18}H_{19}BrN_6O_5$ ; CAS n° 268221-71-2) e C.I. Disperse Orange 37 ( $C_{17}H_{15}Cl_2N_5O_2$ ; CAS n° 13301-61-6).

As concentrações utilizadas do azocorante (200 µg/L e 50 µg/L) foram determinadas por meio de testes-piloto, a partir de sucessivas diluições de uma solução de 100 mg/L do

corante comercial preto em água ultrapura, a fim de possibilitar um desenvolvimento viável das técnicas citogenéticas utilizadas (coloração convencional e bandamento RON), antes e após tratamento de biodegradação bacteriana.

As concentrações testadas nesse estudo abrangem uma faixa das concentrações dos componentes do corante comercial preto encontradas em amostras ambientais derivadas de efluentes têxteis, estudados por Oliveira et al. (2007), onde foram detectadas concentrações para dois dos três corantes constituintes do produto comercial: 57,9 µg/L de C.I. Disperse Blue 373 e 316 µg/L de C.I. Disperse Orange 37, nas amostras de efluente bruto; e concentrações de 67 µg/L de C.I. Disperse Blue 373 e 126 µg/L de C.I. Disperse Orange 37, nas de efluente tratado.

Os ensaios foram realizados com sementes de *A. cepa* (Asparaginales: Alliaceae) de uma única variedade, para se evitar o uso de material genético diferente durante o desenvolvimento do estudo, o que seria difícil se fossem utilizados bulbos, devido às diferenças de variedades disponíveis no mercado ao longo do ano.

Os experimentos de biodegradação do corante comercial preto foram realizados com um “pool” de bactérias heterotróficas, provenientes de tratamento biológico de um sistema de tratamento de efluentes, adicionado ao meio de cultura líquido Sabouraud (2,0 g de peptona; 8,0 g de glicose; 4,0 g de extrato de malte e 200 mL de água destilada). Os microorganismos foram previamente incubados em estufa a 35°C, por 3 dias. Em seguida, foram realizados os testes em tubos de ensaios esterilizados, onde o volume final foi de 10 mL para cada tubo, como segue:

- *Testes Branco*: Branco 1: 8,0 mL de meio de cultura + 2,0 mL de água destilada; Branco 2: 8,0 mL de meio de cultura + suspensão bacteriana + 2,0 ml de água destilada.

- *Testes com o corante comercial preto*: Concentração de 50 µg/L: 8,0 mL de meio de cultura + suspensão bacteriana + 1,5 mL de água destilada + 0,5 mL do da solução estoque de 100 mg/L do azocorante; Concentração de 200 µg/L: 8,0 mL de meio de cultura + suspensão bacteriana + 2,0 mL da solução estoque de 100 mg/L do azocorante.

Os microorganismos foram novamente incubados, por mais quatro dias (período em que os microorganismos atingiram um crescimento ótimo), tendo permanecido em estufa, a uma temperatura ótima de 35 °C. Posteriormente, todos os tubos foram levados à autoclave a 1 atm, por 10 minutos. Após a autoclavagem, foram realizados os ensaios de germinação das sementes de *A. cepa*, sempre em duplicata, para uma maior confiabilidade dos resultados.

Sementes de *A. cepa* foram germinadas, a temperatura ambiente ( $21 \pm 4$  °C), em placas de Petri cobertas com papel de filtro embebido em água ultrapura. Quando as raízes atingiram, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento, elas foram transferidas para placas de Petri cobertas com papel de filtro embebido com as concentrações de 50 µg/L e 200 µg/L do corante comercial preto. Foram realizados testes com e sem o tratamento bacteriano. As raízes dos testes controle negativo (água ultrapura, branco 1 e branco 2) e positivo ( $9 \times 10^{-5}$  M de metilmetanosulfonato) (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), assim como dos ensaios com o corante, permaneceram nessas placas por um período de 20 horas. Decorrido este tempo, foram coletadas algumas raízes de cada placa de Petri e o restante delas foi transferido para placas cobertas com papel de filtro embebido em água ultrapura, para um tratamento de recuperação por um período de 48 horas. Após este período, foram realizadas novas coletas de algumas das raízes. As raízes remanescentes permaneceram nas placas de Petri por mais 24 horas, para um tratamento de recuperação de 72 horas, sendo, após este período, todas coletadas.

Todas as raízes coletadas (controles, tratamento de 20 horas e de recuperação de 48 e 72 horas) foram fixadas em solução de Carnoy (Álcool-Ácido Acético 3:1 – v/v) por 18 horas, em T.A. Após a fixação, as raízes foram transferidas para uma nova solução de Carnoy, onde foram conservadas em refrigerador, até sua utilização na confecção de lâminas de coloração convencional e de bandamento RON.

Para o ensaio de coloração convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares), as raízes fixadas foram coradas pela reação de Feulgen, como descrito por Feulgen e Rossenbeck, apud Mello e Vidal (1978). Após a coloração, as regiões meristemáticas das raízes foram cobertas com lamínula e, cuidadosamente, esmagadas em uma gota de solução de carmim acético a 2%. As lamínulas foram removidas com nitrogênio líquido e as lâminas, montadas em resina sintética (Mounting Media, Permout®, Fisher Scientific), e analisadas em microscópio de luz.

Pela análise das lâminas, foram consideradas algumas anormalidades celulares, como aberrações cromossômicas e nucleares (ACN). Foram considerados vários tipos de aberrações no ciclo celular, tais como: perda de material genético, aderência cromossômica, c-metáfase, ponte cromossômica, multipolaridade, poliploidia, broto nuclear e células binucleadas. Estas ACN foram classificadas como *endpoint* de genotoxicidade. A presença de micronúcleos e de quebras cromossômicas (MN/Q) nas células meristemáticas de *A. cepa* foi considerada como



*endpoint* de mutagenicidade, separadamente das ACN. Células apoptóticas e necróticas (AP/NE), ou seja, em processos de morte celular, foram consideradas como *endpoint* de citotoxicidade. O Índice Mitótico (IM), isto é, a relação do número de células em divisão sobre o total de células analisadas, foi outra categoria analisada, indicativa de citotoxicidade. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e foi contabilizado um total de 10.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 20 lâminas avaliadas (10 lâminas para cada bateria de experimentos). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (VIEIRA, 2004), aceitando a probabilidade de 0,05 para indicar um efeito significativo.

Também foram confeccionadas lâminas das regiões não meristemáticas (células F1) das raízes de *A. cepa*, por meio do protocolo descrito por Ma et al. (1995), para que fossem verificadas as frequências de MN destas células. Para o preparo da lâmina com a região F<sub>1</sub>, foi seccionada uma porção do tecido situado acima da região meristemática (cerca de 1 mm acima), que corresponde, exatamente, à região F<sub>1</sub> da raiz. A coloração deste material seguiu o mesmo protocolo descrito para a região meristemática, já descrito anteriormente. Esses experimentos também foram realizados em duplicata e foi contabilizado um total de 2.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 200 células por lâmina, compreendendo um total de 10 lâminas (5 lâminas para cada bateria de experimentos). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (VIEIRA, 2004), aceitando a probabilidade de 0,05 para indicar um efeito significativo.

Para o preparo das lâminas de Bandamento RON, foi realizado um tratamento prévio dos meristemas radiculares em solução enzimática de celulase/pectinase (2:20 – v/v), por 60 minutos. Após um banho de 2 minutos em água destilada, os meristemas foram seccionados e dispostos em lâminas, cobertos com lamínula e suavemente esmagados em uma gota de solução de ácido acético a 45%. Em seguida, as lamínulas foram removidas das lâminas, após congelamento em nitrogênio líquido. Para a coloração das lâminas, foi seguido o protocolo proposto por Hizume et al. (1980), como segue: adição sobre o material disposto em lâmina de uma 1 gota de solução coloidal (gelatina a 1%) e duas gotas de AgNO<sub>3</sub> a 50%. Posteriormente, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida, para serem incubadas em banho-Maria a 60° C, por, aproximadamente, 5 a 6 minutos ou até que o material da lâmina apresentasse uma cor marrom-dourada. As lâminas foram montadas em resina sintética (Mounting Media, Permount®, Fisher Scientific), para serem analisadas em microscópio de

luz. A avaliação das lâminas foi feita pela observação das possíveis alterações presentes nas células, bem como pela quantificação da variação do número de nucléolos nas células interfásicas, comparando os diferentes testes e tratamentos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e foi contabilizado um total de 10.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 20 lâminas (10 lâminas para cada bateria de experimentos). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ou teste H (VIEIRA, 2004), com nível de significância de 0,05.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### A. Ensaio de Coloração Convencional

Os resultados dos I.M. das células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas aos testes com o corante comercial preto nas concentrações de 50 µg/L e 200 µg/L (com e sem o tratamento bacteriano), aos testes controle negativo (água ultrapura, branco 1 e branco 2) e positivo ( $9 \times 10^{-5}$  M de MMS), obtidos a partir do ensaio de coloração convencional, são mostrados na Tabela 1. No presente estudo, a análise dos I.M. das células meristemáticas de *A. cepa* não foi conclusiva nem totalmente eficiente para a avaliação da citotoxicidade deste azocorante, uma vez que foram encontrados I.M. significativamente menores tanto nos testes com o corante como nos testes controle negativo com o meio de cultura (branco 1) e com meio de cultura associado ao “pool de bactérias” (branco 2), em relação ao controle negativo (água ultra pura). De acordo com Caritá e Marin-Morales (2008), I.M. inferiores ao controle negativo podem indicar a potencialidade de comprometimento nas taxas de crescimento e de desenvolvimento de organismos expostos à ação de químicos. Desta forma, todos os testes, com exceção do controle negativo com água milli-Q, apontaram para uma potencialidade de alteração nos índices de crescimento da planta usada como organismo teste. Após os tratamentos de recuperação, foram observados I.M. ainda menores para os testes com o azocorante sem biodegradação bacteriana, o que pode indicar a persistência deste químico nas células, sugerindo que ocorra uma ação contínua desse composto no organismo-teste, mesmo após o estabelecimento da normalização das condições de exposição.

Apesar dos I.M. dos testes com o azocorante biodegradado mostrarem valores ligeiramente mais altos que os não biodegradados, portanto, mais próximos do controle negativo, é possível atribuir uma ação citotóxica aos metabólitos do corante, formados pela biodegradação bacteriana, pelos índices de morte celular registrados para os tratamentos com o referido corante (Tabela 2). As frequências significativas de necrose, observadas em todos os testes com o azocorante no tratamento de 20 horas (Tabela 2), indubitavelmente, confirmam a nossa sugestão de que o azocorante e, principalmente, seus metabólitos, são altamente citotóxicos às células meristemáticas de *A. cepa*. Segundo Kaioumova et al. (2001), a perturbação de células por agentes químicos pode levar a uma seqüência complexa de eventos que podem resultar em morte celular. No entanto, a redução significativa nas frequências de morte celular, verificada após os tratamentos de recuperação em água ultrapura (Tabelas 3 e 4), indica que os meristemas de *A. cepa* podem se recuperar dos danos citotóxicos decorrentes tanto da ação do azocorante como dos produtos da degradação bacteriana.

As ACN verificadas no presente estudo foram relacionadas a eventos de genotoxicidade, por se tratarem de danos que interferem no material genético das células, mas sem comprovação efetiva de fixação no organismo, quer seja por poderem ser, eventualmente, reparados ou por caracterizarem injúrias que possam levar a célula à morte, não se fixando nas gerações celulares posteriores ao estabelecimento do dano. As altas e significativas frequências de ACN (Tabelas 2 a 4), observadas nas raízes expostas aos diferentes testes e tratamentos com o azocorante, sem e com ação microbiana, demonstraram a ação genotóxica deste químico, corroborando dados apresentados por Caritá e Marin-Morales (2008), que observaram algumas aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*, decorrentes da ação de efluentes contendo este azocorante. Além disso, as maiores e significativas frequências de ACN, observadas nos testes com o azocorante tratado com bactérias, indicam que os metabólitos gerados pela biodegradação do corante são mais genotóxicos que o próprio azocorante comercial. De acordo com Chung e Stevens (1993), a formação de produtos do metabolismo, decorrentes da redução da ligação azo dos azocorantes pela ação microbiana, está associada a eventos genotóxicos, devido à capacidade desses metabólitos reagirem com a molécula de DNA, danificando-a de diferentes maneiras (ARLT et al., 2002; BARTSCH, 1981; UMBUZEIRO et al., 2005). Segundo Levine (1991) e

Stiborova (1992), a redução de azocorantes pode interferir no material genético dos organismos pela formação de adutos de DNA.

Após os tratamentos de recuperação, houve uma evidência de redução das frequências de ACN, conforme observado para todos os testes com o azocorante (Tabelas 3 e 4), o que indica uma possível capacidade das células de *A. cepa* reverterem os danos genotóxicos proporcionados pelo referido corante. Considerando cada tipo de ACN separadamente, ficou evidente também, pelo tratamento de 20 horas (Tabela 2), que quanto maior a concentração do azocorante testada, maior é a indução de ACN em níveis significativos. Além das frequências significativas de perdas cromossômicas, aderências cromossômicas, C-metáfases e metáfases poliplóides, registradas para os testes realizados com o corante, foi verificada, ainda, uma maior indução de alterações do tipo brotos nucleares e células binucleadas para os ensaios realizados após a biodegradação da maior concentração do corante pelas bactérias, o que confirma uma ação genotóxica mais pronunciada para esta concentração. Enquanto os valores significativos de perdas de material genético na prófase parecem ter sido o tipo de ACN mais associado à ação do azocorante original, as aderências cromossômicas, brotos nucleares e células binucleadas foram as alterações celulares mais evidentes nos testes com o azocorante biodegradado, o que indica que, neste último caso, as ACN foram, preferencialmente, originadas pelos metabólitos do corante. Além disso, a persistência dos altos e significativos valores de aderências cromossômicas no teste com a maior concentração do azocorante, após biodegradação e recuperação, reforça a evidência de que os metabólitos desse químico promovem, nas células meristemáticas de *A. cepa*, mais dano genotóxico do que o corante não biorremediado com esses microorganismos.

Segundo Marcano e Del Campo (1995), Türkoglu (2007) e Leme et al. (2007), as aderências cromossômicas são sinais comuns da ação tóxica de um químico sobre o material genético. Os efeitos deste tipo de alteração podem ser irreversíveis para as células, podendo, inclusive, decorrer em morte celular. Conforme pode ser visto nas tabelas 2 a 4, estas alterações (morte) também foram registradas nas nossas análises. Este efeito pode ter sido induzido pelo próprio azocorante ou por seus metabólitos, que promovem o impedimento da migração cromossômica para os pólos, devido à ação aneugênica que possuem. Esta ação leva a um estacionamento da divisão celular em metáfase e, posteriormente, às aderências cromossômicas. Para Marcano et al. (2004), estas alterações originam pontes e, conseqüentemente, quebras cromossômicas, afirmação esta corroborada por Giacomelli

(1999), que acrescenta ainda que as pontes cromossômicas podem ser múltiplas e persistirem até a telófase. As pontes cromossômicas também podem ser resultantes de terminações cromossômicas coesivas ou rearranjos estruturais (FISKESJÖ, 1993). Além disso, aderências cromossômicas também podem originar perdas cromossômicas (MARCANO et al., 2004), as quais são consideradas, ainda, potenciais causadoras de células aneuplóides e poliplóides. A presença significativa de perdas de material genético na prófase, nos testes com as duas concentrações do azocorante não biodegradado, e de perdas cromossômicas na metáfase, anáfase e telófase, para a maior concentração do azocorante, na presença e na ausência de biodegradação por bactérias (tratamento de 20 horas) (Tabela 2) sugerem, mais uma vez, uma ação aneugênica tanto do azocorante como de seus metabólitos.

As c-metáfases podem ser originadas por agentes aneugênicos, que promovem a completa inativação do fuso mitótico da célula (FISKESJÖ, 1985 e 1993), gerando outros tipos de alterações, tais como células binucleadas, portadoras de micronúcleos (KRISCH-VOLDERS et al., 2002; FERNANDES et al., 2007) e poliplóides (ODEIGAH et al., 1997; FERNANDES et al., 2009). No presente estudo, foram observadas c-metáfases em frequências significativas para a maior concentração do azocorante sem biodegradação bacteriana, no tratamento de 20 horas (Tabela 2), e com biodegradação bacteriana, nos tratamentos de 20 e 72 horas (Tabelas 2 e 4), corroborando os estudos de Caritá e Marin-Morales (2008), que mostraram a presença de c-metáfases e de células com micronúcleos, após exposição de sementes de *A. cepa* a efluentes contaminados com azocorantes. Esses resultados indicam que tanto o corante comercial preto BDCP como os seus metabólitos decorrentes da degradação bacteriana podem interferir na formação do fuso mitótico, inibindo, primeiramente, a organização da placa equatorial e, conseqüentemente, a divisão dos centrômeros, comprovando, assim, as suas ações aneugênicas. É importante considerar, ainda, que as c-metáfases induzidas pelos testes com o azocorante tratado com microorganismos mostraram cromossomos bem mais empacotados e curtos que àquelas originadas pelos testes sem biodegradação bacteriana (Figura 1). A presença dessa anormalidade pode estar relacionada com as significativas frequências de células binucleadas e poliplóides nas raízes expostas aos testes com o azocorante tratado com bactérias (Tabelas 2 e 3).

Os brotos nucleares podem estar associados à presença de c-metáfases, alterações estas que podem levar as células a poliploidização e, conseqüentemente, à presença de frequências significativas de micronúcleos, conforme citações de Fernandes et al. (2007). Segundo esses

autores, as células expostas a agentes aneugênicos, especificamente aqueles que interferem na polimerização dos fusos mitóticos, podem se poliploidizar (amplificação do material genético). Alguns autores, baseados em análises em linfócitos humanos (SHIMIZU et al., 1998), e em *A. cepa* (FERNANDES et al., 2007), sugerem que o DNA amplificado de célula poliploidizadas, eventualmente forma broto, originando micronúcleos que podem ser expulsos sob a forma de “mini células”. Em nossos experimentos, foram observados valores estatisticamente significativos de brotos nos núcleos interfásicos, após exposição das raízes de *A. cepa* às duas concentrações do azocorante biodegradado por bactérias, o que ratifica a intensificação do efeito aneugênico do azocorante, após processo de biodegradação bacteriana, devido à ação mais drástica dos metabólitos deste corante sobre as células expostas (Tabelas 2 a 4; Figura 1).

A mutagenicidade do azocorante foi estimada pelos registros de indução de MN/Q em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição aos diferentes testes com o azocorante (Tabelas 2 a 4). Essas alterações estão intimamente associadas a eventos de mutagenicidade, por se tratarem de alterações nos cromossomos ou no DNA, que podem ser repassadas para as novas gerações celulares, e assim serem fixadas nos organismos (VENTURA et al., 2008). O presente estudo mostrou frequências significativas de MN/Q nas células meristemáticas expostas ao azocorante, antes do processo de biodegradação por bactérias, no tratamento de 20 horas (Tabela 2), bem como na maior concentração do azocorante não tratado com esses microorganismos, no tratamento de 48 horas (Tabela 3), mostrando que o corante comercial preto é mutagênico nas referidas concentrações e tratamentos. Como as quebras cromossômicas não foram alterações significativas, a atribuição do efeito mutagênico do corante é dado pela alta e significativa frequência de células micronucleadas, corroborando estudos realizados por Caritá e Marin-Morales (2008), que mostraram a presença desta alteração em raízes de *A. cepa* expostas a efluentes industriais contaminados pelo BDCP. Oliveira (2005) associou os altos valores de atividade mutagênica em *Salmonella* à presença do corante comercial preto em amostras ambientais do Ribeirão dos Cristais. Estudos realizados por Rajaguru et al. (1999), Al-Sabti (2000), Matsuoka et al. (2001), Wollin e Gorlitz (2004), Biswas e Khuda-Bukhsh (2005) e Tsuboy et al. (2007) associaram as altas frequências de MN, induzidos por azocorantes em células de animais, a ação mutagênica destes corantes. Nossos dados mostraram um decréscimo nas frequências de MN/Q, após os tratamentos de recuperação (Tabelas 3 e 4), significativo apenas para a menor concentração

do azocorante no tratamento de 72 horas (Tabela 4), o que indica que a ação mutagênica da maior concentração desse químico não é completamente cessada, mesmo após a interrupção da exposição do organismo-teste a essa dosagem do azocorante.

A ausência de valores significativos de células meristemáticas portadoras de MN/Q, verificada nos testes com o azocorante biodegradado por bactérias (Tabelas 2 a 4), sugere que os metabólitos desse químico estão mais associados com a indução de alterações genotóxicas do que mutagênicas nestas células. Porém, pelas altas frequências de MN registradas para as células F<sub>1</sub> expostas aos testes com o azocorante biodegradado por bactérias, nos tratamentos de 20 e 48 horas (Tabela 5, Figura 1), podemos inferir que os metabólitos deste azocorante promovem alterações genotóxicas nas células meristemáticas que se fixam em forma de células portadoras de MN na geração F<sub>1</sub>, confirmando, assim, o efeito mutagênico destes metabólitos sobre células de *A. cepa*. A redução nas frequências destas alterações, após o tratamento de recuperação de 72 horas (Tabela 5), sugere que os metabólitos do BDCP podem não ser cumulativos, após a normalização das condições de exposição das raízes em água ultrapura. Segundo Ribeiro (2003), MN observados em células F<sub>1</sub> podem ser resultantes de danos não reparados ou reparados de maneira incompleta pelas células parentais (neste caso, as meristemáticas). O presente estudo também pôde confirmar uma ação mutagênica do azocorante ao revelar altas frequências de MN em células F<sub>1</sub> submetidas aos testes com as concentrações do azocorante, sem biodegradação pelos microorganismos, no tratamento de 20 horas (Tabela 5). A persistência de frequências significativas e ainda maiores de MN nas células obtidas da região não meristemática de *A. cepa*, observada após os tratamentos de recuperação para o teste com a concentração mais alta do corante (Tabela 5), indica um potencial perigo do corante para o ambiente, devido à persistência da ação mutagênica dessa dosagem, que provavelmente seja a disponível em ecossistemas aquáticos, uma vez que se encontra próxima dos valores encontrados em amostras ambientais dos efluentes industriais estudados por Oliveira et al. (2007).

De maneira geral, pelos resultados das anormalidades celulares (ACN, MN/Q e AP/NE), obtidos no tratamento de 20 horas (Tabela 2; Figura 2) com o azocorante, antes e após biodegradação, foi possível observar um maior potencial tóxico do corante pós biodegradação por bactérias, o que reforça uma ação mais drástica dos metabólitos deste azocorante (entre eles, provavelmente as aminas aromáticas, originadas pela redução das ligações azo) do que o próprio corante, apesar de ambos estarem envolvidos com a indução

das alterações celulares anteriormente descritas. O presente estudo confirma as citações de Bell et al. (2000) e Kammradt (2004), que afirmaram que a alta periculosidade de compostos secundários, originados pela degradação microbiana, deve-se às suas maiores potencialidades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, quando comparado ao composto original. Além disso, os dados referentes a todas as anormalidades celulares (ACN, MN/Q e AP/NE), observadas para o tratamento de 20 horas (Tabela 2; Figura 2), mostraram que, quanto maior a concentração do azocorante testado, maiores são as frequências de células alteradas, havendo, portanto, uma relação dose-resposta positiva da toxicidade do produto. A redução na frequência total de células alteradas, após os tratamentos de recuperação (Tabelas 3 e 4; Figura 2), indica que os meristemas de *A. cepa* têm a possibilidade de se recuperar dos danos induzidos pelo azocorante e seus metabólitos.

#### B. Bandamento AgRON

Após a exposição das células meristemáticas de *A. cepa* aos testes com o azocorante, antes e após biodegradação por bactérias, verificou-se que a maioria dos micronúcleos apresentou região organizadora de nucléolo (Figura 3). Estudos realizados por Cermeño et al. (1984) mostraram que a perda ou inativação de RONS podem estar relacionadas a fatores como deleção ou translocação. A presença e a ausência de RONS nos micronúcleos das células meristemáticas de *A. cepa* indica que o azocorante e seus metabólitos podem agir aleatoriamente sobre os cromossomos, podendo estar, desta maneira, algumas vezes diretamente envolvidos com as regiões relacionadas a sítios de DNAr, que são imprescindíveis em processos de transcrição e tradução protéica. Pelos valores significativos de morte celular e de presença de micronúcleos portadores de RONS, observados nos testes aqui realizados com o corante, antes e após biodegradação por bactérias, podemos inferir que a perda e, conseqüentemente, a falta de cromossomos portadores de RONS no núcleo principal pode levar a uma inviabilização das atividades fisiológicas da célula, levando-as, desta maneira, à morte.

Segundo Arkhipchuk et al. (2000), a variação do número de nucléolos em plantas é decorrente da ação de agentes genotóxicos. No presente estudo, as análises da quantidade de nucléolos das células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas aos testes com o corante comercial preto nas concentrações de 50 µg/L e 200 µg/L, com e sem biodegradação por



bactérias (Tabelas 6 a 8), mostraram-se eficientes para a avaliação da genotoxicidade do BDCP. Pelos resultados obtidos com os testes do azocorante, foi verificado um alto e significativo número de nucléolos por célula nos teste com o composto químico, quando comparados ao teste controle negativo com água milli-Q. O teste com a concentração de 200 µg/L do azocorante, não biorremediado, e os testes com o azocorante biorremediado com as bactérias mostraram frequências significativas de células com 6 nucléolos, no tratamento de 20 horas. Além disso, o teste com a concentração de 50 µg/L biorremediado com bactérias exibiu valores significativos de células com 7 nucléolos. Esses dados sugerem que a quantidade de nucléolos observada seja resultante de uma ação do azocorante e dos produtos da biodegradação bacteriana deste químico sobre as células, confirmando a ação genotóxica do BDCP e de seus metabólitos, já descritos para os outros testes realizados. Os tratamentos de recuperação minimizaram os efeitos genotóxicos causados por estes compostos às células, pois, após os períodos de recuperação, observou-se um decréscimo significativo de células com 6 nucléolos (teste com a concentração de 200 µg/L biorremediada) e 7 nucléolos (teste com a concentração de 50 µg/L biorremediada com bactérias) (Tabelas 6 a 8).

## **CONCLUSÕES**

Este estudo fornece dados referentes à toxicidade do corante comercial preto BDCP (Black Dye Commercial Product) e dos produtos gerados pela biodegradação do corante por bactérias heterotróficas, provenientes de uma estação de tratamento biológico de efluentes. A partir das diferentes análises realizadas, pôde-se constatar que, quando o azocorante foi tratado com bactérias, ele teve sua potencialidade tóxica aumentada, provavelmente, devido à formação de aminas aromáticas decorrentes da clivagem das ligações azo.

Apesar dos tratamentos de recuperação terem reduzido as frequências de danos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, em quase todos os ensaios realizados, os efeitos provocados pelo corante e seus metabólitos não foram totalmente eliminados. Esses resultados são preocupantes, principalmente pelos altos índices de morte celular promovidos pelo corante e seus metabólitos, bem como pela comprovada fixação dos danos causados nas células.

A técnica de citogenética convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares) mostrou-se bastante útil para fornecer informações com relação aos diferentes

mecanismos de ação do corante comercial preto e dos produtos da sua degradação bacteriana. A técnica de bandamento AgRON forneceu algumas informações adicionais importantes sobre a ação genotóxica do corante e seus metabólitos, por demonstrar uma variação no número de nucléolos maior para os tratamentos com o azocorante, quando comparados com o controle negativo, podendo, assim, ser indicada como uma metodologia complementar em análises da toxicidade de químicos ambientais.

O presente estudo fornece um embasamento científico importante sobre os riscos ambientais que os efluentes contaminados por corantes têxteis possam promover em águas superficiais receptoras. Nossos dados mostram também a necessidade eminente de se avaliar a efetividade dos tratamentos biológicos dos efluentes industriais, visto que, muitas vezes, os resultados da biodegradação podem ser ainda mais detrimenais para o ambiente, pela alta toxicidade dos metabólitos produzidos durante o próprio processo de biodegradação.

#### **AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem à Professora Gisela de Aragão Umbuzeiro, do Centro Superior de Educação Tecnológica – CESET - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pelo fornecimento do corante comercial preto utilizado no presente estudo.

**Tabela 1.** Índices Mitóticos (I.M.) observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), antes e após tratamento de recuperação.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Associação ao meio de cultura			
			50	200	Meio de cultura			
					B	B + A50	B + A200	
20 h	22,120(0,010) <sup>a</sup>	15,490(0,010) <sup>a</sup>	20,750(0,010)	20,800(0,010)	18,780(0,010) <sup>a</sup>	18,940(0,009) <sup>a</sup>	21,560(0,010)	18,670(0,010) <sup>ab</sup>
48 h - rec.	25,320(0,010) <sup>c</sup>	20,900(0,010) <sup>c</sup>	13,130(0,010) <sup>ac</sup>	13,970(0,011) <sup>ac</sup>	17,620(0,010) <sup>a</sup>	20,090(0,009) <sup>a</sup>	20,360(0,010) <sup>b</sup>	18,200(0,010) <sup>a</sup>
72 h - rec.	22,630(0,010)	20,550(0,010)	13,320(0,010) <sup>ac</sup>	16,330(0,011) <sup>c</sup>	17,940(0,010)	20,000(0,010)	18,740(0,010)	19,490(0,010)

**Nota.** CN, Controle Negativo; **CP.** Controle Positivo; **B.** "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; **B+A50.** "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante. 50 µg/L do azocorante; **B+A200.** "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante. 10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 2.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de 20 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)				Associação ao meio de cultura			
			50		200		B	B + A50	B + A200	
			Meio de cultura							
<b>ACN</b>										
Perdas de material genético	0,170(0,016)	1,040(0,012) <sup>a</sup>	1,310(0,021) <sup>a</sup>	1,390(0,020) <sup>a</sup>	0,330(0,015)	0,210(0,011)	0,330(0,013)	0,250(0,016) <sup>b</sup>		
Perdas cromossômicas	0,020(0,010)	0,130(0,013)	0,130(0,013)	0,390(0,019) <sup>a</sup>	0,100(0,021)	0,040(0,009)	0,120(0,016)	0,380(0,016) <sup>a</sup>		
Aderências cromossômicas	0,020(0,010)	0,180(0,010)	0,290(0,018) <sup>a</sup>	0,340(0,018) <sup>a</sup>	0,170(0,016)	0,490(0,026) <sup>a</sup>	1,800(0,018) <sup>ab</sup>	0,670(0,019) <sup>a</sup>		
Brotos nucleares	0	0,090(0,011)	0,060(0,014)	0,070(0,021)	0,410(0,017) <sup>a</sup>	0,450(0,012) <sup>a</sup>	0,900(0,024) <sup>ab</sup>	1,820(0,024) <sup>ab</sup>		
C-metáfases	0,050(0,010)	0,050(0,010)	0,050(0,010)	0,300(0,015) <sup>a</sup>	0,110(0,014)	0,250(0,014)	0,250(0,024)	0,740(0,026) <sup>a</sup>		
Poliploidias (metáfase)	0,010(0,011)	0,120(0,013)	0,120(0,014)	0,160(0,021) <sup>a</sup>	0	0	0	0,400(0,018) <sup>a</sup>		
Poliploidias (intérfase)	0,010(0,011)	0,050(0,015)	0,120(0,020)	0	0,020(0,022)	0,040(0,025)	0,020(0,016)	0,250(0,020)		
Pontes cromossômicas	0,030(0,010)	0,170(0,014)	0,110(0,013)	0,130(0,016)	0,060(0,009)	0,110(0,024)	0,080(0,009)	0,040(0,009)		
Multipolaridades	0,020(0,010)	0,080(0,013)	0,110(0,013)	0,140(0,016)	0,040(0,009)	0,020(0,009)	0,040(0,009)	0,110(0,014)		
Binucleadas	0	0,190(0,012) <sup>a</sup>	0,080(0,016)	0,060(0,009)	0	0,020(0,014)	0,320(0,021) <sup>a</sup>	0,480(0,013) <sup>ab</sup>		
Total de ACN	0,330(0,015)	2,100(0,015) <sup>a</sup>	2,380(0,021) <sup>a</sup>	2,980(0,016) <sup>a</sup>	1,240(0,014)	1,630(0,013)	3,860(0,013) <sup>a</sup>	5,140(0,012) <sup>a</sup>		
<b>MN/Q</b>										
Micronúcleos	0,210(0,018)	2,220(0,011) <sup>a</sup>	1,170(0,013) <sup>a</sup>	1,060(0,027) <sup>a</sup>	0,480(0,021)	0,230(0,015)	0,290(0,013)	0,510(0,019)		
Quebras Cromossômicas	0,050(0,019)	0,440(0,028)	0,220(0,019)	0,280(0,020)	0,140(0,020)	0,040(0,017)	0,070(0,019)	0		
Total de MN/Q	0,260(0,010)	2,660(0,022) <sup>a</sup>	1,390(0,036) <sup>a</sup>	1,340(0,018) <sup>a</sup>	0,620(0,019)	0,270(0,021)	0,360(0,024)	0,510(0,019)		
<b>AP/NE</b>										
Células em apoptose	0	0,030(0,014)	0	0,110(0,000)	0	0	0	0		
Células em necrose	0	0,780(0,033) <sup>a</sup>	0,990(0,051) <sup>a</sup>	1,190(0,038) <sup>a</sup>	0,110(0,021)	0,210(0,033)	1,820(0,045) <sup>a</sup>	2,190(0,056) <sup>a</sup>		
Total de AP/NE	0	0,810(0,044) <sup>a</sup>	0,990(0,051) <sup>a</sup>	1,300(0,055) <sup>a</sup>	0,110(0,021)	0,210(0,033)	1,820(0,045) <sup>a</sup>	2,190(0,056) <sup>a</sup>		
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	0,590(0,043)	5,570(0,026)	4,760(0,057)	5,620(0,062)	1,970(0,034)	2,110(0,036)	6,040(0,038) <sup>a</sup>	7,840(0,041) <sup>a</sup>		

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; B. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; B+A50. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; B+A200. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 3.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 48 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura			Associação ao meio de cultura		
			50	200	cultura			B	B + A50	B + A200
					0	0	0			
<b>ACN</b>										
Perdas de mat. genético	0,240(0,018)	1,800(0,014) <sup>ac</sup>	0,810(0,034)	0,920(0,031)	0,110(0,020)	0,110(0,019)	0,110(0,024) <sup>c</sup>	0,250(0,015)		
Perdas cromossômicas	0,080(0,010)	0,250(0,014)	0,070(0,010)	0,160(0,013)	0,060(0,009)	0,080(0,013)	0,130(0,018)	0,160(0,018)		
Aderênc. cromossômicas	0,070(0,010)	0,130(0,013)	0,280(0,019)	0,140(0,014)	0,080(0,014)	0,110(0,019)	0,990(0,026) <sup>a</sup>	0,720(0,021) <sup>a</sup>		
Brotos nucleares	0,010(0,014)	0,080(0,016)	0,060(0,019)	0,060(0,020)	0,600(0,014) <sup>a</sup>	0,750(0,024) <sup>a</sup>	0,500(0,036) <sup>abc</sup>	0,660(0,018) <sup>ab</sup>		
C-metáfases	0,020(0,010)	0,250(0,015) <sup>bc</sup>	0,080(0,010)	0,100(0,012) <sup>c</sup>	0,150(0,018)	0,300(0,019) <sup>a</sup>	0,150(0,018)	0,190(0,014)		
Poliploidias (metáfase)	0,010(0,011)	0 <sup>c</sup>	0,060(0,014)	0,100(0,022)	0	0	0	0,040(0,012) <sup>c</sup>		
Poliploidias (intérfase)	0	0,100(0,017)	0,070(0,018)	0,150(0,019) <sup>ac</sup>	0,040(0,020)	0	0,060(0,010)	0,130(0,019)		
Pontes cromossômicas	0	0,310(0,021) <sup>a</sup>	0,150(0,017) <sup>a</sup>	0,100(0,022)	0,020(0,015)	0,020(0,010)	0,120(0,005)	0,210(0,014) <sup>a</sup>		
Multipolaridades	0,020(0,010)	0,170(0,012) <sup>a</sup>	0,060(0,010)	0,100(0,014)	0	0,040(0,013)	0,100(0,015)	0,080(0,012)		
Binucleadas	0	0,100(0,014)	0,060(0,009)	0,070(0,009)	0,080(0,009)	0	0,080(0,012) <sup>c</sup>	0,140(0,010) <sup>bc</sup>		
Total de ACN	0,450(0,018)	3,190(0,013) <sup>ac</sup>	1,700(0,022)	1,900(0,016) <sup>a</sup>	1,140(0,020)	1,410(0,013)	2,240(0,019) <sup>a</sup>	2,580(0,013) <sup>ac</sup>		
<b>MN/Q</b>										
Micronúcleos	0,210(0,017)	2,450(0,018) <sup>a</sup>	0,890(0,019)	1,110(0,017) <sup>a</sup>	0,230(0,021)	0,15(0,014)	0,210(0,023)	0,420(0,020)		
Quebras Cromossômicas	0,010(0,013)	0,300(0,015) <sup>a</sup>	0,130(0,012)	0,150(0,021)	0	0,02(0,024)	0,020(0,023)	0,020(0,020)		
Total de MN/Q	0,220(0,012)	2,750(0,049) <sup>a</sup>	1,020(0,025)	1,260(0,068) <sup>a</sup>	0,230(0,063)	0,17(0,022)	0,230(0,036)	0,440(0,045)		
<b>AP/NE</b>										
Células em apoptose	0	0	0	0	0	0	0	0,040(0,022)		
Células em necrose	0	0,060(0,027) <sup>c</sup>	0,050(0,022) <sup>c</sup>	0,460(0,039) <sup>ac</sup>	0,290(0,025)	0,73(0,015) <sup>a</sup>	0,500(0,044) <sup>abc</sup>	0,270(0,033) <sup>c</sup>		
Total de AP/NE	0	0,060(0,027) <sup>c</sup>	0,050(0,022) <sup>c</sup>	0,460(0,039) <sup>ac</sup>	0,290(0,025)	0,73(0,015) <sup>a</sup>	0,500(0,044) <sup>abc</sup>	0,310(0,047) <sup>c</sup>		
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>										
	0,670(0,045)	6,000(0,042) <sup>a</sup>	2,770(0,037)	3,620(0,056)	1,660(0,023)	2,31(0,041)	2,970(0,025)	3,330(0,036)		

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; B. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; B+A50. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; B+A200. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 4.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 72 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)			Associação ao meio de cultura			
			50		200	B		B + A50	B + A200
			Meio de cultura			B	B + A50	B + A200	
<b>ACN</b>									
Perdas de material genético	0,190(0,013)	1,190(0,012) <sup>a</sup>	0,370(0,021) <sup>c</sup>	0,690(0,027)	0,020(0,010)	0,120(0,016)	0,150(0,015)	0,200(0,014)	
Perdas cromossômicas	0,040(0,014)	0,390(0,012) <sup>ac</sup>	0,140(0,014)	0,130(0,016)	0,020(0,010)	0,130(0,016)	0,020(0,009) <sup>c</sup>	0,140(0,012)	
Aderências cromossômicas	0,070(0,010)	0,090(0,012)	0,270(0,020)	0,220(0,015)	0,080(0,018)	0,060(0,009) <sup>c</sup>	0,270(0,015) <sup>ac</sup>	0,920(0,018) <sup>a</sup>	
Brotos nucleares	0	0,080(0,015)	0,070(0,013)	0,070(0,021)	0,350(0,022) <sup>a</sup>	0,330(0,011) <sup>a</sup>	0,210(0,016) <sup>ac</sup>	0,470(0,028) <sup>abc</sup>	
C-metáfases	0,030(0,010)	0,150(0,018)	0,090(0,010)	0,130(0,015)	0,040(0,010)	0,150(0,018)	0,100(0,013)	0,330(0,024) <sup>a</sup>	
Poliploidias (metáfase)	0	0,030(0,012)	0,090(0,014)	0,090(0,025)	0	0	0,040(0,012)	0,020(0,022) <sup>c</sup>	
Poliploidias (intérfase)	0	0,080(0,020)	0,120(0,014)	0,160(0,022) <sup>ac</sup>	0,120(0,020)	0,040(0,016)	0,040(0,016)	0,210(0,030) <sup>a</sup>	
Pontes cromossômicas	0,010(0,013)	0,110(0,021)	0,080(0,015)	0,130(0,021) <sup>a</sup>	0,040(0,014)	0,060(0,021)	0,080(0,023)	0,140(0,022) <sup>a</sup>	
Multipolaridades	0,040(0,012)	0,020(0,015)	0,080(0,016)	0,140(0,022)	0	0,020(0,009)	0	0,100(0,008)	
Binucleadas	0	0,040(0,014) <sup>c</sup>	0,060(0,019)	0,090(0,015)	0	0	0,080(0,013) <sup>c</sup>	0,120(0,017) <sup>c</sup>	
Total de ACN	0,380(0,014)	2,180(0,011) <sup>a</sup>	1,370(0,018) <sup>c</sup>	1,850(0,017) <sup>ac</sup>	0,670(0,016) <sup>c</sup>	0,910(0,011) <sup>c</sup>	0,990(0,013) <sup>c</sup>	2,650(0,011) <sup>ac</sup>	
<b>MN/Q</b>									
Micronúcleos	0,250(0,018)	2,060(0,016) <sup>a</sup>	0,500(0,011) <sup>c</sup>	1,040(0,017)	0,040(0,010) <sup>c</sup>	0,080(0,009) <sup>c</sup>	0,250(0,011)	0,310(0,018)	
Quebras Cromossômicas	0,010(0,020)	0,130(0,017) <sup>c</sup>	0,080(0,015)	0,130(0,004)	0,020(0,024)	0	0	0,020(0,010)	
Total de MN/Q	0,260(0,014)	2,190(0,047) <sup>a</sup>	0,580(0,045) <sup>c</sup>	1,170(0,039)	0,060(0,009) <sup>c</sup>	0,080(0,016) <sup>c</sup>	0,250(0,033)	0,330(0,054) <sup>c</sup>	
<b>AP/NE</b>									
Células em apoptose	0	0,020(0,024)	0,050(0,019)	0,020(0,025)	0	0	0	0,140(0,037)	
Células em necrose	0,050(0,034)	0,300(0,019)	0,240(0,026) <sup>c</sup>	0,460(0,033) <sup>ac</sup>	0,150(0,024)	0	0,090(0,039) <sup>c</sup>	0,390(0,028) <sup>ac</sup>	
Total de AP/NE	0,050(0,034)	0,320(0,046)	0,290(0,055) <sup>c</sup>	0,480(0,061) <sup>ac</sup>	0,150(0,024)	0	0,090(0,039) <sup>c</sup>	0,530(0,029) <sup>ac</sup>	
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>									
	0,690(0,024)	4,690(0,039) <sup>a</sup>	2,240(0,044) <sup>c</sup>	3,500(0,051)	0,880(0,019)	0,990(0,014)	1,330(0,026) <sup>c</sup>	3,510(0,029)	

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; B. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; B+A50. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; B+A200. "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 5.** Frequências de MN observados em células F1 de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), antes e após tratamento de recuperação.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura		Associação ao meio de cultura	
			50	200	B	B + A50	B + A200	
20 horas	0,390(0,069)	9,310(0,072) <sup>a</sup>	5,020(0,061) <sup>a</sup>	5,680(0,057) <sup>a</sup>	0,960(0,070)	2,050(0,071)	4,380(0,056) <sup>a</sup>	4,610(0,052) <sup>a</sup>
48 horas - rec.	0,290(0,073)	8,070(0,066) <sup>a</sup>	2,060(0,054) <sup>c</sup>	9,380(0,057) <sup>ac</sup>	0,790(0,071)	0,890(0,066)	2,790(0,058) <sup>ac</sup>	3,420(0,057) <sup>a</sup>
72 horas - rec.	0,290(0,073)	4,820(0,056) <sup>ac</sup>	1,480(0,062) <sup>c</sup>	5,910(0,054) <sup>a</sup>	0,780(0,088)	0,390(0,049) <sup>c</sup>	1,470(0,085) <sup>c</sup>	1,180(0,077) <sup>bc</sup>

**Nota.** CN, Controle Negativo; CP, Controle Positivo; B, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; B+A50, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante. 50 µg/L do azocorante; B+A200, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante. 2000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 6.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de 20 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)			Meio de cultura			Associação ao meio de cultura			
			50	200	Meio de cultura		Associação ao meio de cultura					
					B	B + A50	B	B + A200				
Nº de nucléolos por célula												
1	10,570(0,011)	12,410(0,011)	13,200(0,011)	13,430(0,012)	14,220(0,010) <sup>a</sup>	13,600(0,010)	15,190(0,010) <sup>a</sup>	13,060(0,011)				
2	43,620(0,011)	45,370(0,010)	40,930(0,010)	43,090(0,010)	40,100(0,010)	38,570(0,010)	39,310(0,010)	32,900(0,010) <sup>ab</sup>				
3	43,320(0,010)	36,420(0,010) <sup>a</sup>	37,860(0,010)	36,070(0,011) <sup>a</sup>	39,940(0,010)	42,040(0,010)	35,590(0,010) <sup>a</sup>	40,440(0,010)				
4	1,920(0,014)	4,580(0,031)	6,820(0,024) <sup>a</sup>	5,910(0,012) <sup>a</sup>	4,580(0,010)	4,020(0,010)	8,080(0,011) <sup>a</sup>	10,180(0,011) <sup>a</sup>				
5	0,570(0,014)	0,780(0,012)	1,070(0,024)	1,000(0,016)	0,810(0,014)	1,250(0,011)	1,250(0,016)	2,980(0,012) <sup>ab</sup>				
6	0	0,280(0,010) <sup>a</sup>	0,100(0,012)	0,460(0,009) <sup>a</sup>	0,340(0,010) <sup>a</sup>	0,510(0,010) <sup>a</sup>	0,400(0,012) <sup>ab</sup>	0,460(0,010) <sup>a</sup>				
7	0	0,130(0,012) <sup>a</sup>	0,020(0,010)	0,030(0,011)	0	0	0,180(0,010) <sup>a</sup>	0				
8	0	0,030(0,020)	0	0,010(0,011)	0	0	0	0				

**Nota.** CN, Controle Negativo; CP, Controle Positivo; B, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; B+A50, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante. 50 µg/L do azocorante; B+A200, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante. 10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 7.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 48 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura		Associação ao meio de cultura	
			50	200	Meio de cultura		Associação ao meio de cultura	
					B	B + A50	B	B + A200
<b>Nº de nucléolos por célula</b>								
1	10,740(0,012)	14,270(0,012)	10,690(0,012) <sup>c</sup>	12,630(0,012)	10,080(0,011) <sup>c</sup>	12,720(0,010)	12,710(0,011) <sup>c</sup>	12,380(0,010)
2	39,580(0,010) <sup>c</sup>	46,470(0,011) <sup>a</sup>	36,140(0,011)	34,910(0,011)	33,490(0,011) <sup>c</sup>	42,880(0,010) <sup>c</sup>	44,790(0,010) <sup>abc</sup>	42,410(0,010) <sup>c</sup>
3	37,280(0,010) <sup>c</sup>	25,990(0,012) <sup>ac</sup>	39,420(0,010)	37,960(0,009) <sup>c</sup>	45,040(0,010) <sup>ac</sup>	35,660(0,010) <sup>c</sup>	33,990(0,010) <sup>b</sup>	36,250(0,010) <sup>c</sup>
4	11,560(0,014) <sup>c</sup>	9,910(0,012) <sup>c</sup>	9,780(0,018)	10,690(0,017)	10,040(0,015) <sup>c</sup>	6,400(0,010) <sup>ac</sup>	7,330(0,011)	8,280(0,010) <sup>c</sup>
5	0,780(0,012)	2,860(0,025) <sup>ac</sup>	2,870(0,015) <sup>ac</sup>	2,410(0,018) <sup>ac</sup>	1,130(0,017)	1,620(0,015)	0,850(0,024) <sup>b</sup>	0,680(0,019) <sup>bc</sup>
6	0,060(0,010)	0,490(0,014) <sup>a</sup>	1,050(0,010) <sup>a</sup>	1,370(0,012) <sup>a</sup>	0,220(0,014)	0,730(0,011) <sup>a</sup>	0,340(0,014)	0 <sup>bc</sup>
7	0	0 <sup>c</sup>	0,050(0,011)	0,030(0,010)	0	0	0 <sup>c</sup>	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0

**Nota.** CN, Controle Negativo; CP, Controle Positivo; B, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; B+A50, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; B+A200, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 8.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante comercial preto (BDCP) e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 72 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura		Associação ao meio de cultura	
			50	200	Meio de cultura		Associação ao meio de cultura	
					B	B + A50	B	B + A200
<b>Nº de nucléolos por célula</b>								
1	11,340(0,012)	16,350(0,010) <sup>ac</sup>	12,970(0,010)	12,750(0,011)	12,110(0,010)	13,920(0,010)	12,030(0,011) <sup>c</sup>	12,600(0,011)
2	42,580(0,010)	43,030(0,011)	34,550(0,012) <sup>a</sup>	36,210(0,012) <sup>c</sup>	38,360(0,011)	36,130(0,010) <sup>a</sup>	30,190(0,010) <sup>ac</sup>	38,190(0,011)
3	40,690(0,010)	34,070(0,011) <sup>a</sup>	38,950(0,010)	37,400(0,010)	40,130(0,010)	36,730(0,011) <sup>c</sup>	41,550(0,010) <sup>c</sup>	37,190(0,010) <sup>c</sup>
4	4,930(0,013) <sup>c</sup>	6,130(0,012)	11,430(0,021)	11,840(0,019)	8,280(0,013) <sup>c</sup>	11,750(0,011) <sup>ac</sup>	13,680(0,010) <sup>ac</sup>	10,470(0,012) <sup>a</sup>
5	0,300(0,014) <sup>c</sup>	0,260(0,022) <sup>c</sup>	1,920(0,011) <sup>ac</sup>	1,480(0,013) <sup>a</sup>	0,990(0,016)	1,290(0,012)	2,140(0,011) <sup>ac</sup>	1,410(0,012) <sup>a</sup>
6	0,160(0,010) <sup>c</sup>	0,160(0,012)	0,150(0,015)	0,270(0,020)	0,140(0,009) <sup>c</sup>	0,180(0,011) <sup>c</sup>	0,400(0,014) <sup>ab</sup>	0,140(0,010) <sup>c</sup>
7	0	0,020(0,010) <sup>c</sup>	0,050(0,009)	0	0	0	0 <sup>c</sup>	0
8	0	0	0,010(0,011)	0	0	0	0	0

**Nota.** CN, Controle Negativo; CP, Controle Positivo; B, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura; B+A50, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; B+A200, "Pool" de bactérias associado ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

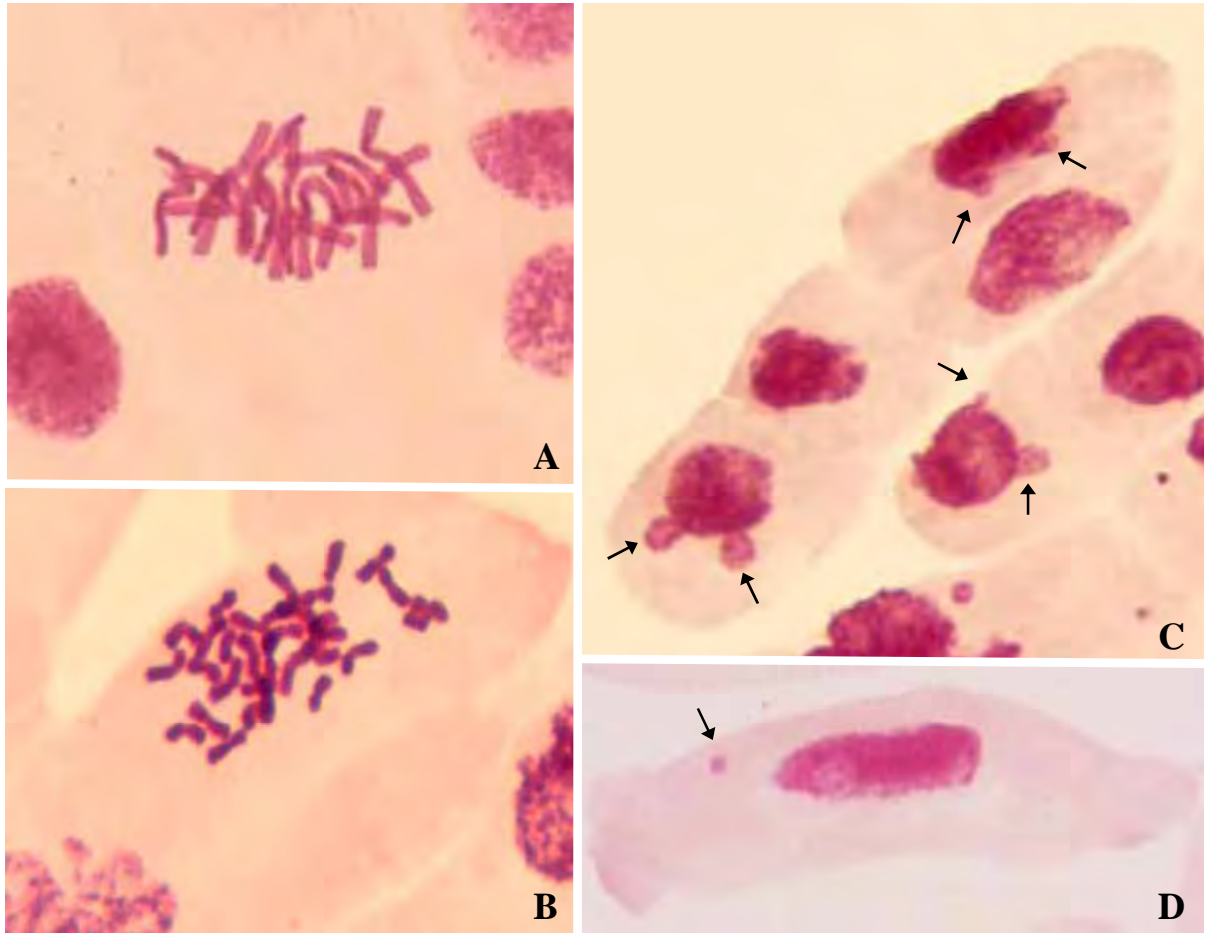
10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

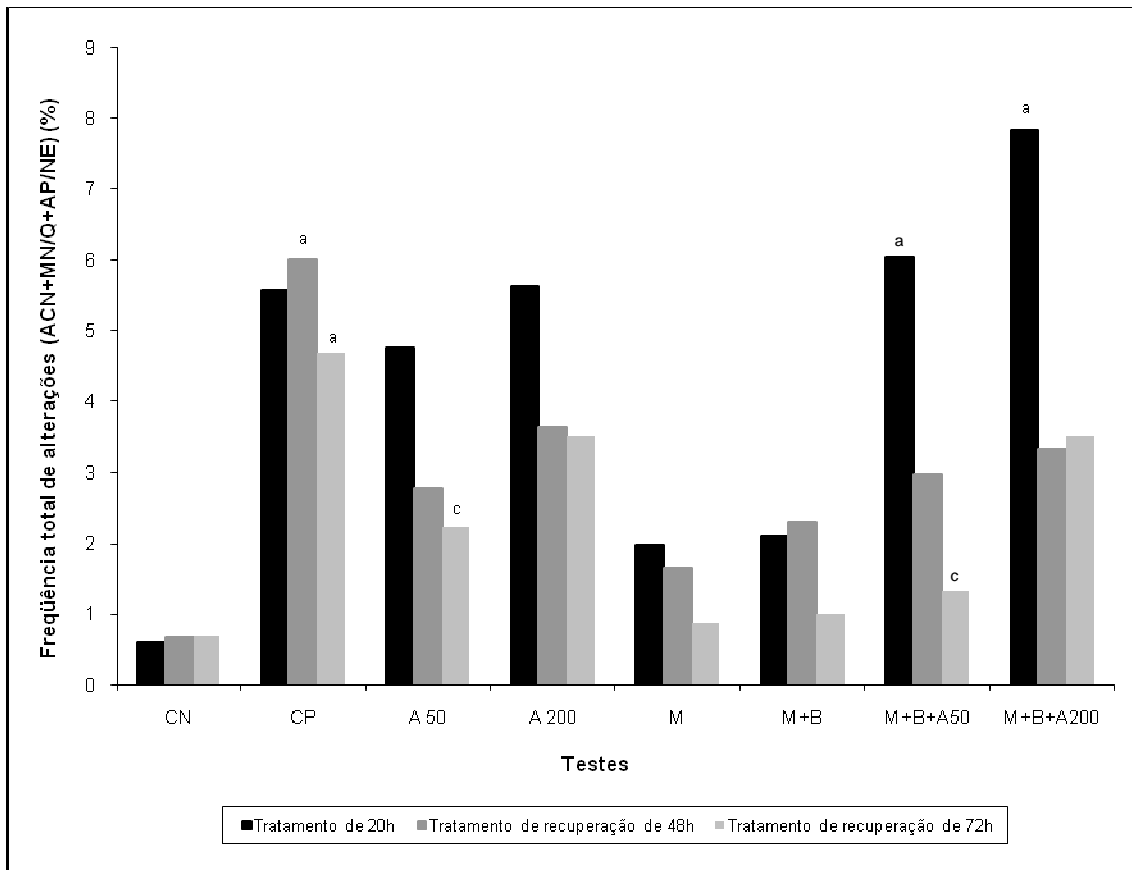
<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.





**Figura 1. Danos observados nas células das raízes de *Allium cepa* tratadas com um azocorante têxtil (BDCP - Black Dye Commercial Product).**

**A.**C-metáfase (corante sem biorremediação bacteriana); **B.** C-metáfase (com biorremediação bacteriana); **C.** Brotos nucleares (setas); **D.** Micronúcleo em célula F1 (seta).



**Figura 2.** Frequência total de células portadoras de alterações (ACN+MN/Q+AP/NE), antes e após os tratamentos de recuperação.

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.



**Figura 3. Célula meristemática de *Allium cepa* tratada com um azocorante têxtil (BDCP - Black Dye Commercial Product), submetida à metodologia de Bandeamento RON. Micronúcleo portador da região organizadora de nucléolo (seta) e micronúcleo sem a região organizadora de nucléolo (cabeça de seta).**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K. Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 149-155, 2000.

ALVES DE LIMA, R.O.; BAZO, A.P.; SAVADORI, D.M.F.; RECH, C.M.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research**, v. 626, p. 53-60, 2007.

ANDREAS, K.; KLEIN, J.; KUDLICH, M.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J.; MATTES, R. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid. Degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3684-3690, 1997.

ARKHIPCHUK, V.V.; MALINOVSKAYA, T.T.; GARANKO, N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuate* cells. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 338-344, 2000.

ARLT, V.M.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PAPEL, U.; SORG, B.L.; SCHMEISER, H.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of environmental contaminant 3- nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferases. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1937-1945, 2002.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresources Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BARTSCH, H. Metabolic activation of aromatic amines and azo dyes. **International Agency of Research on Cancer**, v. 40, p.13-30, 1981.

BELL, J.; PLUMB, J.J.; BUCKLEY, C.A.; STUCKEY, D.C. Treatment and decolourization of dyes in anaerobic baffled reactor. **Journal of Environmental Engineering**, v. 126, p. 1026-1032, 2000.

BHASKAR, M.; GNANAMANI, A.; GANESHJEEVAN, R.J.; CHANDRASEKAR, R.; SADULLA, S.; RADHAKRISHNAN, G. Analyses of carcinogenic aromatic amines released from harmful azo colorants by *Streptomyces* sp. SS07. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 117-123, 2003.

BISWAS, S.J., KHUDA-BUKHSH, A.R. Cytotoxic and genotoxic effects of the azo-dye p-dimethylaminoazobenzene in mice: a time-course study. **Mutation Research**, v. 587, p. 1-8, 2005.

BROWN, D.; LABOUREUR, P. The aerobic biodegradability of primary aromatic amines. **Chemosphere**, v. 12, p. 405-414, 1983.

CAO, W.B.; MAHADEVAN, D.L.; CRAWFORD, R.L. Characterization of an extracellular azo dye-oxidizing peroxidase from *Flavobacterium* sp. ATCC 39723. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 810-817, 1993.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, p. 159-168, 2002.

CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R. Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. **Heredity**, v. 53, p. 603-611, 1984.

CHEN, K.C., HUANG, W.T., WU, J.Y.; HOUNG, J-Y. Microbial decolourisation of azo dyes by *Proteus mirabilis*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 686-690, 1999.

CHUNG, K.T.; STEVENS, J.R. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

CLARKE, E.A.; ANLIKER, R. Organic dyes and pigments. In: Hutzinger, O., Editor. The handbook of environmental chemistry, v. 3, part. A. **Anthropogenic Compounds**. Estados Unidos: Springer-Verlag, 1980. 215 p.

CONSTANTIN, M.J.; OWENS, E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays – a report of the US EPA's GENETOX Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 1-12, 1982.

COUGHLIN, M.F.; KINKLE B.K.; BISHOP, P.L. Degradation of azo dyes containing aminonaphthol by *Sphingomonas* sp. strain 1CX. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 341-346, 1999.

EDWARDS, J.C. **Investigation of color removal by chemical oxidation for three reactive textile dyes and spent textile dye wastewater**. 2000. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências Ambientais) – Departamento de Engenharia Ambiental e Civil, Universidade do Estado da Virginia, Blackburg, 2000.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2005. 212 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

FERNANDES, T.C.C; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERREIRA, I. **Síntese e biodegradação de corantes azo pelo *Phanerochaete chrysosporium***. 1998. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, 1998.

FISKESJÖ, G. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, New York, v. 8, p. 461-470, 1993.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul**. 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 1999.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, v. 281, p. 89-92, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations. **Mutation Research**, v. 426, p. 107-112, 1999.

GRIFFITHS, J. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed., Oxford, 1984, p. 30.

HAO, O.J.; KIM, H.; CHIANG P-C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 449-505, 2000.

HIZUME, M.; SATO, S.; TANAKA, A. A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. **Stain Technology**, v. 55, v. 87-90, 1980.

HOLME, I. Ecological aspects of color chemistry. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed. Oxford: Society of Chemistry Industry, 1984, 128 p.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

HU, T.L. Degradation of azo dye RP2-B by *Pseudomonas luteola*. **Water Science Technology**, v. 38, p. 299-306, 1998.

ISIK, M.; SPONZA, D.T. Effect of different oxygen conditions on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1183-1192, 2003.

JADHAV, J.P.; PARSHETTI, G.K.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, p. 394-400, 2007.

JEWORSKI, M; HEINZLE, E. Combined chemical-biological treatment of wastewater containing refractory pollutants. **Biotechnology Annual Review**, v. 6, p. 163-196, 2000.

JIANG, J.; GILL, B.S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. **Genome**, v. 36, p. 792-795, 1993.

JONES, J.J.; FALKINHAM, I.I.I.J.O. Decolourization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic *Mycobacteria*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p. 2323-2326, 2003.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, v. 62, p. 64-74, 2001.

KAMMRADT, P.B. **Remoção de cor de efluentes de tinturarias industriais através de processo de oxidação avançada**. 2004, 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KECK, A.; KLEIN, J.; KUDLICH, M.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J.; MATTES, R. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3684-3690, 1997.

KIM, E.S.; PUNINA, E.O.; RODIONOV, A.V. Chromosome CPD (PI/DAPI) – and CMA/DAPI – Banding Patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, p. 392-398, 2002.

KIM, S.J.; SHODA, M. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 62, p. 114-119, 1999.

KRISCH-VOLDERS, M.; VANDHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KUDLICH, M.; KECK A.; KLEIN J.; STOLZ, A. Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3691-3696, 1997.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 25, p.78, 2002.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471- 486, 1938.

LEVINE, W.G. Metabolism of azo dyes: implications for detoxication and activation. **Drug Metab. Rev.**, v. 23, p. 253-309, 1991.

LOIDL, M.; HINTEREGGER, C.; DITZELMÜLLER, G.; FERSCHL, A.; STREICHS-BIER, F. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains. **Archives of Microbiology**, v. 155, p. 56-61, 1990.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MARCANO, L.; DEL CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo em poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. tratadas com inhibidores metabólicos. **Ciências**, v. 3, p. 73-82, 1995.

MARCANO, L; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

MARTINS, M.A.; FERREIRA, I.C; SANTOS, I.M.; QUEIROZ M.J.; LIMA N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 91-98, 2001.

MARTINS, M.A.; QUEIROZ, M.J.; SILVESTRE, A.J.; LIMA, N. Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Research Microbiology**, v. 153, p. 361-368, 2002.

MARTINS, M.A.; LIMA, N.; SILVESTRE, A.J.; QUEIROZ, M.J. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, v. 52, p. 967-973, 2003.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MATSUOKA, A.; TADA, A.; TERAOKA, Y; NUKAYA, H.; ÖNFELT, A.; WAKABAYASHI, K. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (azo dyes) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. **Mutation Research**, v. 493, p. 75-85, 2001.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; SMYTH, W.F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 81-87, 2001.



MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.

MUKAI, Y.; FRIEBE, B.; GILL, B.S. Comparison of C-banding patterns and *in situ* hybridization sites using highly repetitive and total genomic rye DNA probes of 'Imperial' rye chromosomes added to 'Chinese Spring' wheat. **Japanese Journal of Genetics**, v. 67, p. 71-83, 1992.

MURRAY, B.G.; BENNETT, M.D.; HAMMETT, K.R.W. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in situ* hybridization. **Heredity**, v. 68, p. 473-478, 1992.

NONY, C.R.; BOWMAN, M.C.; CAIRNS, T.; LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P. Metabolism studies of an azo dye and pigments in the hamster based on analysis of the urine for the potentially carcinogenic aromatic amines. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 4, p. 132-140, 1980.

ODEIGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 126, p. 161-167, 1997.

OLIVEIRA, D.P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais – um estudo de caso**. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v. 626, p. 135-142, 2007.

ORANUSI, N.A.; OGUGBUE, C.J. Degradation of sulphonated azo dyes by *Pseudomonas* sp. **Journal of Applied Science and Environmental Management**, v. 5, p. 13-17, 2001.

ÖZTÜRK, A.; ABDULLAH, M.I. Toxicological effect of indole and its azo dye derivatives on some microorganisms under aerobic conditions. **Science of the Total Environment**, v. 358, p. 137-142, 2006.

PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dyestuffs: Part II, Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation test. **Chemosphere**, v. 15, p. 470-491, 1986.

PASZCZYNSKI, A.; PASTI, M.B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L.; CRAWFORD, R.L. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 378-384, 1991.

PATTERSON, R.M.; BUTLER, J.S. Tartarazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 20, p. 461-465, 1982.

PERCY, A.J.; MOORE, N.; CHIPMAN, J.K. Formation of nuclear abnormalities in rat intestine by benzidine and its biliary metabolites. **Toxicology**, v. 57, p. 217-223, 1989.

PINHEIRO, H.M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, p. 121-139, 2004.

RAFII, F.; HALL, J.D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 35, p. 897-901, 1997.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON, M.A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 444, p. 175-180, 1999.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v.312, p.17-24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1998.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Brasil: ULBRA, 2003. 355p.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

ROWLAND, R.E. Chromosome banding and heterochromatin in *Vicia faba*. **Theoretical and Applied Genetics: International Journal of Plant Breeding Research**, v. 60, p. 275-280, 1981.

RUSS, R.; RAU, J.; STOLZ, A. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1429-1434, 2000.

SAIRNAK, S.; KANEKAR, P. Biodegradation of methyl Violet by *Pseudomonas mendocina* MCM B-402. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.251-254, 1999.

SHARMA, V.K. **Isolation and characterisation of cellulolytic bacteria from a cattle-waste digester**. 1983, 127f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Aberdeen University, UK, 1983.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, v. 2, p. 107-119, 1991.

SO, K.O.; WONG, P.K.; CHANG, K.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Acetobacter liquefaciens*. **Toxicology Assessment**, v. 5, p. 221-235, 1990.

STIBOROVA, M.; FREI, E.; SCHMEISER, H.H. Comparison of cytochrome P-450 and peroxidase-mediated activations of carcinogenic azo dyes and *N*-nitrosamines. **Gen Physiol. Biophys.**, v. 11, p. 489-498, 1992.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 69-80, 2001.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBERIO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007.

TUNA, M.; VOGEL, K.P.; GILL, K.S. ARUMUGANATHAN, K. C-banding analysis of *Bromus inermis* genomes. **Crop Science**, v. 44, p. 31-37, 2004.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4-14, 2007.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

VAN DER ZEE, F.P.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. **Chemosphere**, v. 44, p. 1169-1176, 2001.

VAN DER ZEE, F.P.; BISSCHOPS, I.A.; BLANCHARD, V.G.; BOUWMAN, R.H.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. **Water Research**, v. 37, p. 3098-3109, 2003.

VANDEVIVERE, P.C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Evidences of mutagenic and genotoxic action of the atrazine herbicide using *Oreochromis niloticus* as test system. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42-51, 2008.

VIEIRA, S. **Bioestatística – Tópicos Avançados, Testes não paramétricos, tabelas de contringência e análise de regressão**. 1 ed., Rio de Janeiro: Editora Campus, 2004, p. 23-27.

WEBER, E.J., ADAMS, R.L. Chemical – and sediment – mediated reduction of the azo dye disperse blue 79. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 1163-1170, 1995.

WOLLIN, K.M., GORLITZ, B.D. Comparison of genotoxicity of textile dyestuffs in *Salmonella* mutagenicity assay, in vitro micronucleus assay, and single cell gel/comet assay. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 23, p. 267-278, 2004.

WONG, P.K.; YUEN, P.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. **Water Research**, v. 30, p. 1736-1744, 1996.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 109-114, 2003.

YOO, E.S. Kinetics of chemical decolorization of the azo dye C.I. Reactive Orange 96 by sulfide. **Chemosphere**, v. 47, p. 925-931, 2002.

ZAOYAN, Y.; KE, S.; GUANGLIANG, S.; FAN, Y.; JINSHAN, D.; HUANIAN, M. Anaerobic-aerobic treatment of dye wastewater by combination of RBC with activated sludge. **Water Science and Technology**, v. 26, p. 2093-2096, 1992.

ZHOU, W.; ZIMMERMANN, W. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. **FEMS Microbiol Letters**, v. 107, p. 157-161, 1993.

ZISSI, U.; LYBERATOS, G.; PAVLOU S. Biodegradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis* under aerobic conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p. 49-55, 1997.

**“INDUÇÃO DE EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM CÉLULAS DE *Allium cepa* EXPOSTAS A UM AZOCORANTE TÊXTIL (BDCP), ANTES E APÓS BIODEGRADAÇÃO POR *Candida viswanathii* (SACCHAROMYCETALES: SACCHAROMYCETACEAE)”**

**RESUMO**

O presente estudo avaliou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das concentrações de 50 e 200 µg/L de um azocorante (BDCP - Black Dye Commercial Product), antes e após tratamento de biodegradação por leveduras da espécie *Candida viswanathii*, usando a técnica citogenética de coloração convencional e de bandamento AgRON, em células de *A. cepa*. Diferentes aberrações cromossômicas e nucleares foram verificadas nas células expostas ao corante, antes e após o tratamento de biodegradação. As significativas freqüências de células em necrose, observadas em todos os testes com o azocorante, e a significativa freqüência de células em apoptose, observada no teste com a maior concentração do azocorante biodegradada por leveduras, demonstraram a alta citotoxicidade do corante e de seus metabólitos para as células meristemáticas de *A. cepa*. Os metabólitos do azocorante induziram mais danos genotóxicos que o próprio azocorante. A redução significativa na freqüência total de células alteradas, após os tratamentos de recuperação, especialmente, o de 72 horas, indica que os meristemas de *A. cepa* têm a possibilidade de se recuperar dos danos tanto induzidos pelo azocorante como pelos seus metabólitos.

*Palavras-chave* Aberrações cromossômicas, morte celular, bandamento AgRON, corante têxtil, biodegradação por leveduras.

## INTRODUÇÃO

Muitos corantes sintéticos têm causado sérios problemas ambientais, impactando, principalmente, ecossistemas aquáticos que recebem efluentes industriais tratados indevidamente ou não tratados (AL-SABTI et al., 1994). A classe dos azocorantes, que apresenta um ou mais grupos azo (-N=N-) em sua composição (SO et al., 1990; WONG; YUEN, 1996), é a mais extensivamente utilizada pelas indústrias têxteis (KUNZ et al., 2002), devido à sua variedade de cores e suas excelentes características de fixação às fibras têxteis (GRIFFITHS, 1984; CHEN et al., 1999). A liberação de grandes quantidades de resíduos de azocorantes nos corpos aquáticos tem sido, segundo Houk (1992) e O'Neill et al. (1999), uma das maiores responsáveis pela contaminação aquática mundial. Alguns estudos mostraram que muitos azocorantes e subprodutos destes corantes são tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, causando alterações celulares e genéticas aos organismos expostos (CLARKE; ANLIKER, 1980; NONY et al., 1980; CHUNG; STEVENS, 1993; RAFII et al., 1997; KAMMRADT, 2004; UMBUZEIRO et al., 2005, OLIVEIRA et al., 2007).

Estudos realizados com o azocorante comercial preto (Black Dye Commercial Product - BDCP) comprovaram, pelos testes com *Salmonella* (UMBUZEIRO et al., 2005), um potencial mutagênico para este corante. O corante também foi carcinogênico para ratos, como descrevem Alves de Lima et al. (2007). Muitos métodos químicos e físicos têm sido sugeridos e usados para o tratamento de efluentes contendo azocorantes, mas estes métodos não têm se mostrado eficientes, por acumular ainda mais os corantes no ambiente, além de gerar uma poluição secundária, pelo uso excessivo de substâncias químicas no processo de tratamento (JADHAV et al., 2007). Por outro lado, os métodos biológicos não apresentam estes problemas, mas, devido às complexas estruturas químicas dos azocorantes (HOLME, 1984; KIM; SHODA, 1999) e os efeitos tóxicos que podem causar na microbiota ambiental (JEWORSKI; HEINZLE, 2000), é necessário discriminar os microorganismos resistentes dos eficientes na degradação e remoção destes químicos de ambientes contaminados (MARTINS et al., 2001; KUNZ et al., 2002; JADHAV et al., 2007).

Pesquisas de biodegradação de azocorantes por microorganismos têm sido, principalmente, realizada com bactérias e fungos. No entanto, estudos realizados por Kwasniewska (1985) e Kakuta et al. (1998) mostraram que algumas leveduras também são capazes de degradar estes corantes sintéticos. De acordo com Ramalho (2005), as leveduras

são bons agentes de biorremediação para azocorantes, uma vez que seu crescimento e sua viabilidade geralmente não são afetados pela presença de corantes ou de seus metabólitos, os quais são potencialmente carcinogênicos e mutagênicos, além de serem organismos capazes de realizar a completa mineralização de azocorantes. Jadhav e Govindwar (2006) indicaram, ainda, que as leveduras constituem um material biológico de baixo custo e bastante promissor na remoção de azocorantes tóxicos. Estudos realizados por Vitor (2005) demonstraram que a levedura *Candida albicans* degradam o azocorante Direct Violet 51; Donmez (2002) e Aksu e Donmez (2003) mostraram que a levedura *Candida lipolytica* é altamente eficiente para degradar o azocorante Remazol Blue; Meehan et al. (2000) comprovaram que a remoção da cor do Remazol Black-B pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ocorreu devido à adsorção química desse azocorante pela biomassa celular; e Jadhav et al. (2007) demonstraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* degradou, eficientemente, o azocorante tóxico methyl red. Porém, de acordo com Martins et al. (1999) e Ramalho et al. (2002, 2004 e 2005), as espécies *Candida zeylanoides*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia occidentalis* clivam a ligação azo dos azocorantes, por mecanismos de redução, semelhantes aos de muitas bactérias, originando aminas aromáticas. Estas aminas aromáticas, por exemplo a 1-amino-2-naphthol e a *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine, correspondem a produtos semelhantes ou iguais aos gerados nos conhecidos processos de descoloração de corantes por bactérias (RAMALHO et al., 2002). Ohe (1997) demonstrou, pelo teste de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que diferentes aminas aromáticas, tais como MeIQx (2-amino-3,8-dimetilimidazol[4,5-*f*]quinoxalina), Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-*b*]indol), Trp-P-2 (3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-*b*]indol) e PhPI (2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-*b*]piridina), eram as responsáveis pela atividade genotóxica das águas do rio Yodo, no Japão. Um estudo realizado por Kataoka et al. (2000) mostrou, pelo teste de Ames, que as aminas aromáticas Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-*b*]indol), IQ (2-amino-3-methylimidazo-[4,5-*f*]quinoline) e AαC (2-amino-9Hpyrido[2,3-*b*]índole), juntas, representaram 26% de atividade mutagênica do rio Danúbio, na Áustria.

Organismos-testes vegetais têm sido empregados e validados por diversas agências ambientais, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP – United Nations Environmental Program), a Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – United States Environmental Protection Agency) (MA et al., 1995), como modelos genéticos para

avaliação de poluentes (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994), sendo excelentes indicadores de efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas (GRANT, 1994; YI; MENG, 2003). A espécie *Allium cepa* constitui um dos materiais pioneiros nos estudos de aberrações cromossômicas causadas pela ação de agentes físicos e químicos. Esta espécie foi introduzida como sistema-teste por Levan (1938) e, desde então, tem sido usada como um eficiente padrão genético para estudos de toxicidade (GRANT, 1982; CONSTANTIN; OWENS, 1982; SHARMA, 1983; FISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; GRANT, 1994; GRANT, 1999; COTELLE et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Adicionalmente, esta espécie é de baixo custo, fácil manuseio e apresenta importantes características cromossômicas ( $2n=16$  e cromossomos de grande tamanho), o que facilita a avaliação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo de divisão celular (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO et al., 2006).

O ensaio de aberrações cromossômicas em *A. cepa* tem sido considerado um eficiente teste na avaliação dos efeitos de poluentes ambientais (RANK; NIELSEN, 1993; COTELLE et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009), e tem se destacado entre a bateria de testes recomendada para avaliação de agentes genotóxicos (MATEUCA et al., 2006). Usando o ensaio de aberrações cromossômicas em *A. cepa*, Caritá e Marin-Morales (2008) mostraram a mutagenicidade de determinadas concentrações de efluentes industriais contaminados pelo corante BDCP, quando associado a outros poluentes presentes na água de um rio.

O surgimento de novas técnicas de coloração cromossômica, aplicadas com sucesso em cromossomos de plantas (MUKAI et al., 1992; JIANG et al., 1993; TUNA et al., 2004), possibilita uma análise mais detalhada da organização estrutural dos cromossomos do que as técnicas convencionais de coloração (ROWLAND, 1981; KIM et al., 2002). A coloração com o nitrato de prata vem sendo utilizada para identificar os possíveis sítios ativos da RON, em diferentes espécies vegetais (MURRAY et al., 1992; CARVALHO; GUERRA, 2002). A posição das RONS auxilia na melhor compreensão dos eventos de alterações cromossômicas que se estabeleceram em cada cariótipo.

De maneira geral, sabe-se que os azocorantes e os produtos de seu metabolismo têm potencialidade de causar sérios danos aos organismos a eles expostos. Nesse sentido, o



presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diferentes concentrações do azocorante BDCP, antes e após tratamento de biodegradação pela levedura *Candida viswanathii*. A avaliação dos efeitos celulares foi feita por meio da técnica citogenética de coloração convencional (teste de aberrações cromossômicas e nucleares) e por bandamento AgRON, em células de raízes de *A. cepa*, expostas às diferentes concentrações do corante e do produto obtido pela biorremediação do corante pela levedura *C. viswanathii*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram realizados ensaios com o corante comercial preto (BDCP), que é um azocorante composto por 3 corantes (UMBUZEIRO et al., 2005), pertencentes ao grupo dos nitro-aminoazobenzenos: C.I. Disperse Blue 373 ( $C_{21}H_{21}BrN_6O_6$ ; CAS n° 51868-46-3), C.I. Disperse Violet 93 ( $C_{18}H_{19}BrN_6O_5$ ; CAS n° 268221-71-2) e C.I. Disperse Orange 37 ( $C_{17}H_{15}Cl_2N_5O_2$ ; CAS n° 13301-61-6).

Para avaliação dos efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos do corante, foram utilizadas duas concentrações do azocorante (200 µg/L e 50 µg/L), preparadas sempre imediatamente antes da realização dos experimentos. As referidas concentrações foram determinadas por meio de testes-piloto, a partir de sucessivas diluições de uma solução de 100 mg/L do corante comercial BDCP em água ultrapura, a fim de possibilitar uma aplicação viável das técnicas citogenéticas utilizadas nesse estudo (coloração convencional e bandamento AgRON), antes e após tratamento de biodegradação por leveduras.

As concentrações testadas neste estudo estão próximas das doses dos componentes do corante comercial preto, encontradas nas amostras ambientais, obtidas em coletas de amostras de água de um rio que recebe efluente de uma indústria de processamento têxtil, estudadas por Oliveira et al. (2007) (concentrações de 57,9 µg/L de C.I. Disperse Blue 373 e 316 µg/L de C.I. Disperse Orange 37 nas amostras de efluente bruto e concentrações de 67 µg/L de C.I. Disperse Blue 373 e 126 µg/L de C.I. Disperse Orange 37 nas de efluente tratado. Os autores não determinaram a concentração do C.I. Disperse Violet 93).

Como organismo-teste, foram utilizadas sementes de *A. cepa* (Asparaginales: Alliaceae) de uma única variedade (Baia-Perciforme), constituindo um material biológico geneticamente e fisiologicamente homogêneo e de fácil aquisição em todos os períodos do

ano. Essas características evitam diferentes respostas nas várias fases de execuções experimentais, assegurando os resultados obtidos nas diversas repetições.

Os experimentos de biodegradação do corante comercial preto foram realizados com leveduras da espécie *C. wisvanathii*, em meio de cultura líquido Sabouraud (2,0 g de peptona; 8,0 g de glicose; 4,0 g de extrato de malte e 200 mL de água destilada). Os microorganismos foram previamente incubados em estufa a 28 °C, por 3 dias. Posteriormente, foram realizados os testes em tubos de ensaios esterilizados, onde o volume final de cada tubo foi de 10 mL, como segue:

- *Testes Branco*: Branco 1: 8,0 mL de meio de cultura + 2,0 mL de água destilada; Branco 2: 8,0 mL de meio de cultura + suspensão de leveduras + 2,0 ml de água destilada.

- *Testes com o corante comercial preto*: Concentração de 50 µg/L: 8,0 mL de meio de cultura + suspensão de leveduras + 1,5 mL de água destilada + 0,5 mL do da solução estoque de 100 mg/L do azocorante; Concentração de 200 µg/L: 8,0 mL de meio de cultura + suspensão de leveduras + 2,0 mL da solução estoque de 100 mg/L do azocorante.

Após uma nova incubação dos microorganismos em estufa a 28 °C, por mais 4 dias (período em que os microorganismos atingiram um crescimento ótimo), os tubos foram levados à autoclave a 1 atm, por um período de 10 minutos. Imediatamente após a autoclavagem, foram realizados os ensaios de germinação das sementes de *A. cepa*. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Sementes de *A. cepa* foram germinadas em temperatura ambiente ( $21 \pm 4$  °C), em placas de Petri cobertas com papel de filtro embebido em água ultrapura. Quando as raízes atingiram, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento (aproximadamente 5 dias após o início dos experimentos de germinação), elas foram transferidas para placas de Petri cobertas com papel de filtro, contendo, separadamente, as concentrações de 200 µg/L e 50 µg/L do corante comercial preto e as mesmas concentrações após terem passado pelo tratamento de biodegradação por leveduras. Os testes controle negativo (água ultrapura, branco 1 e branco 2) e positivo ( $9 \times 10^{-5}$  M de metilmetanosulfonato) (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) permaneceram nessas placas por um período de 20 horas. Transcorrido este período, foram coletadas algumas raízes de cada placa de Petri, sendo que o restante delas foi transferido para placas recobertas com papel de filtro embebido em água ultrapura, para um tratamento de recuperação por um período de 48 horas. Após novas coletas, as raízes remanescentes

permaneceram nas placas por mais 24 horas, para um tratamento de recuperação de 72 horas, quando novas coletas de raízes foram realizadas.

As raízes coletadas no tratamento de 20 horas e nos tratamentos de recuperação de 48 e 72 horas foram fixadas em solução de Carnoy (Álcool-Ácido Acético 3:1 – v/v) por 18 horas, em T.A. Em seguida, estas raízes foram transferidas para uma nova solução de Carnoy, onde foram conservadas, em refrigerador, até sua utilização para a confecção de lâminas de coloração convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares) e de bandamento AgRON.

Para o ensaio de coloração convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares), as raízes fixadas foram coradas pela reação de Feulgen, como descrito por Feulgen e Rossenbeck, apud Mello e Vidal (1978). Depois da coloração com o reativo de Schiff, as regiões meristemáticas das raízes foram seccionadas e cobertas com lamínula e, levemente, esmagadas em uma gota de solução de carmim acético a 2%. A remoção das lamínulas ocorreu em nitrogênio líquido e a montagem das lâminas foi feita em resina sintética (Mounting Media, Permout®, Fisher Scientific). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de luz, sendo contabilizados os vários tipos de alterações nas células meristemáticas de *A. cepa*. As aberrações cromossômicas e nucleares (ACN), consideradas endpoints de genotoxicidade, foram: perdas cromossômicas, aderências cromossômicas, C-metáfases, pontes cromossômicas, multipolaridades, poliploidias, brotos nucleares e células binucleadas. Alterações consideradas como endpoints de mutagenicidade foram as células portadoras de micronúcleos e de quebras cromossômicas (MN/Q). Dentro de outra categoria (endpoint de citotoxicidade), foram consideradas as células em processo de morte celular, como células apoptóticas e necróticas (AP/NE). O Índice Mitótico (IM), ou seja, a relação do número de células em divisão sobre o total de células analisadas, foi mais uma categoria analisada, também indicativa de citotoxicidade. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, contabilizando um total de 10.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 20 lâminas (10 lâminas para cada bateria de experimentos). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (VIEIRA, 2004), aceitando a probabilidade de 0,05 para indicar um efeito significativo.

Foram confeccionadas lâminas das regiões não meristemáticas das raízes de *A. cepa*, por meio do protocolo descrito por Ma et al. (1995), a fim de que fossem verificadas as

freqüências de MN nas células da região F<sub>1</sub>. Para o preparo dessas lâminas, as raízes foram coradas como descrito anteriormente (reação de Feulgen). As regiões não meristemáticas foram seccionadas em lâminas, cobertas com lamínula e, cuidadosamente, esmagadas em uma gota de solução de carmim acético a 2 %. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em resina sintética, para a posterior análise em microscópio de luz. Todos estes experimentos foram realizados em duplicata, contabilizando um total de 2.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 200 células por lâmina, compreendendo um total de 10 lâminas (5 lâminas para cada bateria de experimentos). A análise estatística também foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (VIEIRA, 2004), aceitando a probabilidade de 0,05 para indicar um efeito significativo.

Para a confecção das lâminas de bandamento AgRON, foi realizado um tratamento prévio dos meristemas radiculares em solução enzimática de celulase/pectinase (2:20 – v/v), por 60 minutos, seguido por um banho de 2 minutos em água destilada. Estes meristemas foram cobertos com lamínula e, suavemente, esmagados em uma gota de solução de ácido acético a 45%. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas deixadas para secar. Os experimentos de bandamento AgRON foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Hizume et al. (1980). As lâminas foram, em seguida, montadas em resina sintética e analisadas em microscópio de luz. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, sendo avaliadas qualitativamente as alterações presentes nas células interfásicas, comparando os diferentes testes e tratamentos entre si.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Pela análise do índice mitótico (IM), foi possível observar que o corante BDCP não apresentou citotoxicidade no tratamento de 20 h, mas teve os índices alterados após os períodos de recuperação de 48 e 72h. Estes resultados sugerem que o corante deve se acumular na célula e ter uma ação tóxica tardiamente manifestada, por isso observado com mais evidência após os períodos de recuperação (Tabela 1).

Os I.M. das células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas aos testes com o azocorante comercial BDCP biodegradado pela levedura, mostram uma redução significativa dos valores para o teste de 20 h e para os testes de recuperação de 48 e 72 h, em relação ao controle negativo (água ultrapura) (Tabela 1). Os testes realizados com o meio de cultura (branco 1)

mostraram redução significativa dos IM, o que sugere uma toxicidade do próprio meio, que pode ser, inclusive, responsável pelos resultados significativos observados para os testes realizados com o corante degradado pela levedura e com meio de cultura associado às leveduras (branco 2), conforme pode ser visto na Tabela 1. Os resultados dos tratamentos de recuperação por 72 h com o corante biodegradado reforçam a indicação de uma ação citotóxica tardia do corante, ou dos seus metabólitos, sobre as células. Esta afirmação baseia-se no fato da cultura associada à levedura, neste tratamento de 72 h, apresentar seus índices normalizados, enquanto que os tratamentos com as duas concentrações do corante apresentaram valores que diferiram, significativamente, do controle negativo (Tabela 1). Estes resultados também indicam que as leveduras degradaram os componentes químicos do meio, produzindo metabólitos que podem estar associados com a ação citotóxica do produto sobre o organismo teste utilizado.

Alterações no IM podem interferir no crescimento e no desenvolvimento de organismos expostos a um agente, sendo um importante parâmetro para estudos de toxicologia ambiental. Segundo Fernandes et al. (2007), a ação citotóxica de uma dada substância pode ser determinada pela capacidade da mesma aumentar ou diminuir os I.M. dos organismos expostos. Os menores I.M. foram observados nos testes com o azocorante sem biodegradação por leveduras, para os tratamentos de recuperação, especialmente na concentração de 50 µg/L, demonstrando, como já citado, que o corante continua a agir nas células, mesmo após cessar a exposição a ele.

As significativas freqüências de células necróticas, observadas em todos os testes com o azocorante, no tratamento de 20 horas, bem como a alta e significativa freqüência de células apoptóticas, observada no teste com a maior concentração do azocorante biodegradada por leveduras (Tabela 2; Figura 1), demonstram que este químico e seus metabólitos são altamente citotóxicos às células meristemáticas de *A. cepa*. Segundo Mello et al. (2001) e Kaioumova et al. (2001), a perturbação de células por agentes químicos pode levar a uma seqüência complexa de eventos que podem resultar em morte celular, dos tipos apoptótica ou necrótica. De acordo com Majno e Joris (1995) e Huppertz et al. (1999), a caracterização de células apoptóticas e necróticas podem ser baseadas na morfologia celular. Os referidos autores afirmam que, durante o processo necrótico, as células primeiramente incham, a membrana plasmática se rompe, e as células são rapidamente lisadas; enquanto que, durante o processo apoptótico, as células primeiramente se reduzem e depois seus núcleos se

condensam, sendo, finalmente, desintegrados em corpos apoptóticos. As diferentes morfologias celulares verificadas no organismo-teste de *A. cepa*, que estão intimamente associadas a eventos característicos de morte celular, tais como a vacuolização citoplasmática, no caso da necrose, e a fragmentação nuclear, no caso da apoptose, podem ser visualizadas na Figura 1. A partir das análises do presente estudo, foi possível observar várias etapas de fragmentação nuclear, caracterizada desde a formação de pequenos brotos nucleares e micronúcleos, até a completa fragmentação do material genético da célula afetada. Estes eventos devem estar intimamente relacionados com a própria ação do azocorante e de seus metabólitos sobre o material genético da célula, na indução de morte celular do tipo apoptótica (Figura 2). Segundo Duke et al (1996), um importante papel da morte celular induzida por agentes químicos físicos ou biológicos, independentemente de ser apoptótica ou necrótica, é a eliminação de células que se tornaram malignas ou que iriam influenciar negativamente a manutenção da normalidade metabólica do organismo. Porém, esta eliminação celular, sem a devida reposição das células afetadas, pode comprometer a viabilidade do organismo, pelo número insuficiente de células para desempenhar cada uma das funções orgânicas necessárias para a manutenção do indivíduo.

A redução nas freqüências de morte celular, verificada após os tratamentos de recuperação, indica que, após a eliminação das células mortas e a normalização das condições ambientais das células, vai havendo uma tendência de diminuição dos processos de morte celular, principalmente observado para os tratamentos de recuperação de 72 h realizados com o corante biodegradado pela levedura (Tabela 2 a 4). Porém, estes valores, quando comparados com o controle negativo, ainda apresentam diferenças estatisticamente significativas, indicando que a ação destas substâncias persiste, enquanto elas estiverem presentes no interior das células ainda vivas. A tendência de decréscimo nos valores de morte pode estar associada à continuidade de divisão celular que ocorre nas células que foram pouco afetadas, o que, após alguns ciclos de divisão, pode levar a uma normalização da viabilidade celular.

Como exposto, a recuperação dos efeitos citotóxicos (morte celular) não se mostrou totalmente eficiente, uma vez que o teste com a menor concentração do azocorante biodegradado pela leveduras, tratamento de 48 horas (Tabela 3), induziu um aumento significativo de células apoptóticas, demonstrando que o corante BDCP foi persistente e teve uma ação citotóxica contínua nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho.

As células meristemáticas de *A. cepa*, expostas aos diferentes testes e tratamentos com o azocorante, sempre exibiram frequências de ACN maiores que as encontradas nos testes controle negativo, embora nem todas as anormalidades registradas tenham exibido índices significativamente diferentes (Tabelas 2 a 4). As frequências significativas de ACN, observadas no presente estudo, comprovam a genotoxicidade do corante BDCP, corroborando estudos realizados por Caritá e Marin-Morales (2008), que observaram indução de aberrações cromossômicas sobre o organismo-teste *A. cepa*, proporcionadas pela ação deste corante e de outros poluentes presentes em amostras de águas de um rio que recebe efluentes industriais, inclusive de uma indústria têxtil. As maiores e significativas frequências de ACN, observadas nos testes com o azocorante biodegradado pela levedura (tratamento de 20 horas) (Tabela 2), indicam que os metabólitos gerados pela biodegradação do corante são mais genotóxicos que o próprio azocorante, além de ter sido também observado que os maiores danos foram registrados para a maior concentração testada (L+A200). Segundo Ramalho et al. (2002), algumas leveduras do gênero *Candida* são capazes de reduzir compostos como os azocorantes, pela clivagem de suas ligações azo, tendo como consequência a produção de aminas aromáticas. Estas aminas apresentam um potencial tóxico para as células (CHUNG; CERNIGLIA, 1992), pela capacidade que possuem em interagir com o material genético, fragmentando-o, formando adutos e afetando os processos de replicação e reparo do DNA (LEVINE, 1991; STIBOROVA, 1992; ARLT et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005).

Após os tratamentos de recuperação, foi observada uma redução nas frequências de ACN, para todos os testes realizados com o azocorante (Tabelas 3 e 4), o que indica que a ação genotóxica, principalmente observada para os metabólitos do corante BDCP, tende a decrescer, quando as células deixam de ser expostas a estas substâncias. Pelos baixos índices mitóticos (IM) registrados, após os períodos de recuperação, podemos inferir que esta diminuição das frequências de ACN pode estar relacionada com a diminuição dos índices mitóticos registrados para estes mesmos ensaios.

Pelas análises realizadas com célula meristemáticas submetidas ao tratamento de 20 horas (Tabela 2), ficou evidente que quanto maior a concentração do azocorante testada, mais tipos de ACN apareceram em frequências significativas. Além disso, no presente estudo, o teste realizado com a maior concentração do azocorante biodegradado pelas leveduras proporcionou frequências significativas de quase todos os tipos de ACN, tais como perdas cromossômicas, aderências cromossômicas, brotos nucleares, C-metáfases, poliploidias

interfásicas, células multipolares e binucleadas, o que indica uma ação genotóxica mais evidente para esta concentração tratada por estes microorganismos. Enquanto as perdas de material genético na prófase parecem ser um tipo de ACN mais associadas à ação do azocorante original (sem biodegradação), as frequências significativas de brotos nucleares, células interfásicas poliplóides e células binucleadas nos testes com o azocorante biodegradado por leveduras, sugerem que esses tipos de danos genotóxicos são, preferencialmente, induzidos pelos metabólitos do azocorante. Portanto, é importante destacar que os metabólitos, resultantes da clivagem do corante pelas leveduras, mostraram uma potencialidade maior de promover danos genotóxicos na fase de intérfase do ciclo celular.

No tratamento de 20 h, foi observada, nos testes com o azocorante sem biodegradação por leveduras, a presença de perdas de material genético, em frequências significativas, na fase de prófase. Já nas fases de metáfase, anáfase e telófase, foi observada, em frequências significativas, a presença de perdas cromossômicas para a maior concentração do azocorante, tanto na presença como na ausência de biodegradação por leveduras (Tabela 2). Estes dados sugerem uma ação aneugênica do azocorante e dos metabólitos originados pela degradação do BDCP. Essas perdas de material genético podem, ainda, ser responsáveis pela presença dos micronúcleos registrados para as células interfásicas, que, possivelmente, seriam gerações celulares subseqüentes àquelas que sofreram a ação genotóxica aneugênica.

Foi observada a presença de anáfases multipolares em frequências significativas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao teste com a maior concentração do azocorante biodegradado por leveduras (tratamentos de 20 e 48 horas) (Tabelas 2 e 3). Estas alterações são, segundo Fernandes et al. (2009), resultantes da ação de substâncias aneugênicas, que impedem a polimerização dos fusos mitóticos, levando a célula à poliploidização. Segundo estes autores, uma substância com ação aneugênica promove a desorganização dos fusos mitóticos, mas não interfere na organização dos centros organizadores de microtúbulos (COM). Desta forma, as células se poliploidizam e os COM se duplicam. Em uma divisão celular subseqüente, se houver a normalização das condições ambientais, vai haver uma divisão cromossômica com formação de mais de 2 pólos estabelecidos. Os cromossomos vão migrar, aleatoriamente, para os vários pólos instituídos na célula, caracterizando as anáfases multipolares.

Os brotos celulares foram observados em frequências significativas para todos os testes e tratamentos com o azocorante na presença de leveduras (Tabelas 2 a 4), Segundo



Fernandes et al. (2007), as poliploidias são consideradas eventos de amplificação do material genético. Este material genético amplificado pode ser eliminado do núcleo, gerando brotos nucleares no início do processo e, posteriormente, micronúcleos e micro células. Desta forma, a presença de brotos nucleares é uma forte evidência de ação aneugênica do azocorante, principalmente, dos seus metabólitos, o que corrobora os resultados anteriormente observados e descritos para esta ação do produto.

A presença de C-metáfases em frequências significativas para a maior concentração do azocorante na presença e na ausência de leveduras, para o tratamento de 20 horas (Tabela 2), indica que tanto o azocorante como os seus metabólitos podem impedir a formação do fuso mitótico. Estes dados confirmam a ação aneugênica já discutida anteriormente. A presença dessa anormalidade pode explicar, ainda, as significativas frequências de células metafásicas poliplóides, nas raízes expostas aos testes com o azocorante sem leveduras, e de células poliplóides interfásicas e binucleadas, observadas nas raízes expostas aos testes com o azocorante tratado com leveduras (Tabela 2), corroborando estudos de Fiskesjö (1985), Odeigah et al. (1997) e Krisch-Volders et al. (2002), que afirmam que células poliplóides e células binucleadas podem ser originadas de ACN do tipo C-metáfases.

As aderências e as perdas cromossômicas foram verificadas em todos os testes e tratamentos com o azocorante, na presença e na ausência da biodegradação (Tabelas 2 a 4). De acordo com Türkoglu (2007), as aderências cromossômicas podem levar a um comprometimento drástico na célula, muitas vezes de caráter irreversível, o que pode levá-la à morte. Giacomelli (1999) e Marcano et al. (2004) afirmam que as aderências cromossômicas podem originar pontes cromossômicas, alterações essas que foram observadas em nosso estudo, porém em valores quase sempre não significativos (Tabelas 2 a 4). Este resultado, talvez esteja relacionado com o alto comprometimento celular promovido pelas aderências, o que induziu a uma maior incidência de mortes celular do que de pontes cromossômicas.

A presença de MN/Q em células meristemáticas, e de MN em células F<sub>1</sub> (região não meristemática) das raízes de *A. cepa*, verificada após exposição aos diferentes testes e tratamentos com o azocorante, comprovou a mutagenicidade do corante comercial preto e de seus subprodutos derivados de metabolização (Tabelas 2 a 5). Segundo Chung e Cerniglia (1992), os azocorantes e seus metabólitos possuem um alto potencial mutagênico para as células de diferentes organismos. As frequências significativas de MN registradas para os testes com a menor concentração do azocorante sem leveduras e para a maior concentração do

azocorante na presença de leveduras, para o tratamento de 20 horas, bem como nos testes com a maior concentração do azocorante sem leveduras, para os tratamentos de 20, 48, mostraram que o azocorante BDCP e seus metabólitos são mutagênicos nessas concentrações e tratamentos. No entanto, os maiores valores registrados para o conjunto de alterações do tipo MN/Q foram observados nos testes sem leveduras (Tabelas 2 a 4), o que mostra que o azocorante original é mais potencialmente mutagênicos que os metabólitos formados na degradação pelas leveduras. A presença de quebras cromossômicas sugere que o azocorante e seus subprodutos têm também ação direta sobre o DNA, caracterizando então um potencial clastogênico para estes produtos. Apesar de terem sido registradas, neste trabalho, a presença de quebras cromossômicas (Tabelas 2 a 4), esses danos só foram significativos para a maior concentração do corante não tratado com leveduras, no tratamento de 72 horas (Tabela 4). Sendo assim, a ação mutagênica do corante deve-se, principalmente, à alta e significativa frequência de MN. O decréscimo significativo nas frequências de MN/Q, após os tratamentos de recuperação (Tabelas 3 e 4), sugere que a ação mutagênica desse químico e de seus subprodutos cessem, ao menos em parte, quando a exposição ao corante é interrompida.

De acordo com Ribeiro (2003), MN presentes em células  $F_1$  podem ser resultantes de danos não reparados ou reparados de maneira incompleta nas células parentais. Leme e Marin-Morales (2007) mostraram que células meristemáticas de *A. cepa*, portadoras de ACN, podem derivar em células  $F_1$  portadoras de micronúcleos. Assim, os registros de altos e significativos valores de MN em células  $F_1$  (Tabela 5) expostas aos testes com o azocorantes antes e após tratamento de biodegradação com levedura, são concordantes com os dados anteriormente descritos nesse estudo, que mostraram a potencialidade mutagênica tanto do azocorante como de seus metabólitos. Os resultados significativos de MN registrados para as células  $F_1$  de *A. cepa*, em todos os tratamentos e testes realizados, indicam uma ação mutagênica cumulativa do corante comercial preto BDCP, sobre as células expostas.

Pela análise geral de todas as anormalidades celulares registradas neste trabalho (ACN, MN/Q e AP/NE), para o tratamento de 20 horas (Tabelas 2; Figura 3), foi possível observar que os metabólitos do BDCP, decorrente da degradação pela levedura *C. viswanathii*, apresentam um potencial tóxico maior que o próprio BDCP, apesar de ambos terem induzido todos os tipos de alterações celulares. Esses dados são concordantes com as citações de Kunz et al. (2002), Kammradt (2004) e Ramalho (2005), que afirmaram que os produtos gerados pela degradação microbiana são mais perigosos aos organismos e ao meio

ambiente que o composto original, devido à sua maior potencialidade tóxica, mutagênica e carcinogênica. Além disso, observou-se, no tratamento de 20 horas, que, quanto maior a concentração do azocorante testado, maiores são as frequências de células danificadas, havendo, então, uma relação positiva de dose-resposta do azocorante para o organismo-teste *A. cepa* (Tabela 2; Figura 3). A redução significativa na frequência total de células alteradas, após os tratamentos de recuperação, especialmente de 72 horas (Tabela 4; Figura 3), indica que os meristemas de *A. cepa* têm a possibilidade de se recuperar dos danos induzidos tanto pelo azocorante como pelos seus metabólitos.

Pelos ensaios de bandamento cromossômico com AgRON, foi verificado que, após a exposição das células meristemáticas de *A. cepa* aos testes e tratamentos com o azocorante, todas as células micronucleadas apresentaram seus micronúcleos com presença de região organizadora de nucléolo. Estas células, porém, apresentaram seu núcleo principal isento destas regiões, o que podemos inferir que as mortes celulares observadas neste estudo possam estar também relacionadas com esta ausência de RONS no núcleo principal. Estes núcleos seriam ineficientes para a síntese de RNAr, produção de ribossomos e síntese protéica, o que, certamente, levaria a um comprometimento sério das atividades celulares, decorrendo em processo de morte celular.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o BDCP (Black Dye Commercial Product), antes e após tratamento de biodegradação com a levedura *C. viswanathii*, apresentou efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, por induzir alterações nos índices mitóticos, morte celular, alterações cromossômicas e nucleares, micronúcleos e quebras cromossômicas nas células do organismo-teste *A. cepa*.

O azocorante BDCP mostrou ser mais tóxico após sofrer biodegradação por leveduras. Houve uma relação positiva de dose-resposta do organismo-teste *A. cepa*, já que as maiores frequências de células danificadas foram observadas para a maior concentração biodegradada pelos microorganismos.

Foi registrada uma alta potencialidade dos metabólitos do azocorante em induzir a formação de células apoptóticas.

O tratamento de recuperação de 72 horas foi eficiente para reduzir a frequência total de células meristemáticas de *A. cepa*, alteradas pela ação do azocorante e de seus subprodutos, mas não foi eficiente para minimizar a frequência de micronúcleos nas células F<sub>1</sub>, para a maior concentração do azocorante BDCP. Estes dados mostram que os danos mutagênicos podem ser fixados nas células e acarretar um comprometimento do organismo.

### **AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem à Professora Gisela de Aragão Umbuzeiro, do Centro Superior de Educação Tecnológica – CESET - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pelo fornecimento do BDCP (Black Dye Commercial Product).

**Tabela 1.** Índices Mitóticos (I.M.) observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações do corante comercial preto, antes e após biodegradação, e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), antes e após tratamento de recuperação.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura			Associação ao meio de cultura			
			50	200	L	L + A50	L + A200	L	L + A50	L + A200	
											200
20 horas	22,120(0,010)	15,490(0,010) <sup>a</sup>	20,750(0,010)	20,800(0,010)	18,780(0,010) <sup>a</sup>	17,660(0,010) <sup>a</sup>	18,220(0,010) <sup>ab</sup>	18,990(0,010) <sup>a</sup>			
48 horas - rec.	25,320(0,010)	20,900(0,010) <sup>ac</sup>	13,130(0,010) <sup>ac</sup>	13,970(0,011) <sup>ac</sup>	17,620(0,010) <sup>a</sup>	19,910(0,009) <sup>a</sup>	18,500(0,009) <sup>a</sup>	21,290(0,009) <sup>a</sup>			
72 horas - rec.	22,630(0,010)	20,550(0,010)	13,320(0,010) <sup>ac</sup>	16,330(0,011) <sup>ac</sup>	17,940(0,010) <sup>a</sup>	21,040(0,010)	19,430(0,009) <sup>a</sup>	18,890(0,010) <sup>a</sup>			

**Nota.** CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; L: Leveduras associadas ao meio de cultura; L+A50: Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; L+A200: Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10.000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 2.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações do corante comercial preto, antes e após biodegradação, e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de 20 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)			Associação ao meio de cultura		
			Meio de cultura			L	L + A50	L + A200
			50	200	10.000			
<b>ACN</b>								
Perdas de material genético	0,170(0,016)	1,040(0,012) <sup>a</sup>	1,310(0,021) <sup>a</sup>	1,390(0,020) <sup>a</sup>	0,330(0,015)	0,230(0,018)	0,380(0,022)	0,350(0,018)
Perdas cromossômicas	0,020(0,010)	0,130(0,013)	0,130(0,013)	0,390(0,019) <sup>a</sup>	0,100(0,021)	0,090(0,012)	0,040(0,009)	0,560(0,019) <sup>a</sup>
Aderências cromossômicas	0,020(0,010)	0,180(0,010)	0,290(0,018)	0,340(0,018) <sup>a</sup>	0,170(0,016)	0,210(0,017)	0,330(0,020) <sup>a</sup>	0,560(0,014) <sup>a</sup>
Brotos nucleares	0	0,090(0,011)	0,060(0,014)	0,070(0,021)	0,410(0,017) <sup>a</sup>	0,440(0,020) <sup>a</sup>	2,090(0,028) <sup>ab</sup>	2,880(0,030) <sup>ab</sup>
C-metáfases	0,050(0,010)	0,050(0,010)	0,050(0,010)	0,300(0,015) <sup>a</sup>	0,110(0,014)	0,280(0,011)	0,170(0,019)	0,330(0,024) <sup>a</sup>
Poliploidias (metáfase)	0,010(0,011)	0,120(0,013)	0,120(0,014)	0,160(0,021) <sup>a</sup>	0	0	0	0,100(0,015)
Poliploidias (intérfase)	0,010(0,011)	0,050(0,015)	0,120(0,020)	0	0,020(0,022)	0,040(0,018)	0,290(0,030) <sup>a</sup>	1,140(0,045) <sup>ab</sup>
Pontes cromossômicas	0,030(0,010)	0,170(0,014)	0,110(0,013)	0,130(0,016)	0,060(0,009)	0,020(0,009)	0,060(0,014)	0,120(0,014)
Multipolaridades	0,020(0,010)	0,080(0,013)	0,110(0,013)	0,140(0,016)	0,040(0,009)	0,040(0,009)	0,040(0,009)	0,390(0,016) <sup>a</sup>
Binucleadas	0	0,190(0,012) <sup>a</sup>	0,080(0,016)	0,060(0,009)	0	0,020(0,010)	0,840(0,020) <sup>ab</sup>	0,690(0,016) <sup>ab</sup>
Total de ACN	0,330(0,015)	2,100(0,015) <sup>a</sup>	2,380(0,021) <sup>a</sup>	2,980(0,016) <sup>a</sup>	1,240(0,014)	1,370(0,012)	4,240(0,013) <sup>a</sup>	7,120(0,012) <sup>a</sup>
<b>MN/Q</b>								
Micronúcleos	0,210(0,018)	2,220(0,011) <sup>a</sup>	1,170(0,013) <sup>a</sup>	1,060(0,027) <sup>a</sup>	0,480(0,021)	0,150(0,017)	0,710(0,015)	1,040(0,024) <sup>a</sup>
Quebras Cromossômicas	0,050(0,019)	0,440(0,028)	0,220(0,019)	0,280(0,020)	0,140(0,020)	0,040(0,017)	0,110(0,019)	0,060(0,013)
Total de MN/Q	0,260(0,010)	2,660(0,022) <sup>a</sup>	1,390(0,036) <sup>a</sup>	1,340(0,018) <sup>a</sup>	0,620(0,019)	0,190(0,019)	0,820(0,020)	1,100(0,018) <sup>a</sup>
<b>AP/NE</b>								
Células em apoptose	0	0,030(0,014)	0	0,110(0,000)	0	0	0	3,830(0,045) <sup>a</sup>
Células em necrose	0	0,780(0,033) <sup>a</sup>	0,990(0,051) <sup>a</sup>	1,190(0,038) <sup>a</sup>	0,110(0,021)	0,300(0,025)	0,730(0,042) <sup>a</sup>	2,360(0,051) <sup>a</sup>
Total de AP/NE	0	0,810(0,044) <sup>a</sup>	0,990(0,051) <sup>a</sup>	1,300(0,055) <sup>a</sup>	0,110(0,021)	0,300(0,025)	0,730(0,042) <sup>a</sup>	6,190(0,067) <sup>a</sup>
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	0,590(0,043)	5,570(0,026) <sup>a</sup>	4,760(0,057)	5,620(0,062) <sup>a</sup>	1,970(0,034)	1,860(0,036)	5,790(0,060) <sup>a</sup>	14,410(0,049) <sup>a</sup>

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; L. Leveduras associadas ao meio de cultura; L+A50. Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; L+A200. Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10.000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 3.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações do corante comercial preto, antes e após biodegradação, e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 48 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura			Associação ao meio de cultura			
			50	200	L	L + A50	L + A200	L		L + A50	L + A200
								L	L + A50		
<b>ACN</b>											
Perdas de material genético	0,240(0,018)	1,800(0,014) <sup>bc</sup>	0,810(0,034)	0,920(0,031)	0,110(0,020) <sup>c</sup>	0,210(0,017)	0,330(0,011)	0,150(0,015)			
Perdas cromossômicas	0,080(0,010)	0,250(0,014)	0,070(0,010)	0,160(0,013)	0,060(0,009)	0,260(0,013)	0,190(0,013)	0,380(0,018)			
Aderências cromossômicas	0,070(0,010)	0,130(0,013)	0,280(0,019)	0,140(0,014)	0,080(0,014)	0,040(0,009)	0,170(0,019)	0,110(0,013) <sup>c</sup>			
Brotos nucleares	0,010(0,014)	0,080(0,016)	0,060(0,019)	0,060(0,020)	0,600(0,014) <sup>abc</sup>	0,880(0,026) <sup>a</sup>	0,960(0,040) <sup>abc</sup>	1,040(0,022) <sup>abc</sup>			
C-metáfases	0,020(0,010)	0,250(0,015) <sup>ac</sup>	0,080(0,010)	0,100(0,012) <sup>c</sup>	0,150(0,018)	0,190(0,021)	0,230(0,014) <sup>a</sup>	0,210(0,029)			
Poliploidias (metáfase)	0,010(0,011)	0 <sup>c</sup>	0,060(0,014)	0,100(0,022) <sup>a</sup>	0	0	0	0,020(0,026)			
Poliploidias (intérfase)	0	0,100(0,017) <sup>c</sup>	0,070(0,018)	0,150(0,019) <sup>ac</sup>	0,040(0,020)	0,040(0,018)	0,290(0,031) <sup>a</sup>	0,230(0,032) <sup>ac</sup>			
Pontes cromossômicas	0	0,310(0,021) <sup>a</sup>	0,150(0,017) <sup>a</sup>	0,100(0,022)	0,020(0,015)	0,060(0,016)	0,060(0,022)	0,040(0,018)			
Multipolaridades	0,020(0,010)	0,170(0,012) <sup>a</sup>	0,060(0,010)	0,100(0,014)	0	0,060(0,012)	0,110(0,014)	0,170(0,013) <sup>a</sup>			
Binucleadas	0	0,100(0,014)	0,060(0,009)	0,070(0,009)	0,080(0,009)	0	0,170(0,014) <sup>ac</sup>	0,070(0,010) <sup>c</sup>			
Total de ACN	0,450(0,018)	3,190(0,013) <sup>ac</sup>	1,700(0,022)	1,900(0,016) <sup>a</sup>	1,140(0,020)	1,740(0,012)	2,510(0,017) <sup>ac</sup>	2,420(0,014) <sup>ac</sup>			
<b>MN/Q</b>											
Micronúcleos	0,210(0,017)	2,450(0,018) <sup>a</sup>	0,890(0,019)	1,110(0,017) <sup>a</sup>	0,230(0,021)	0,210(0,017)	0,590(0,019)	0,260(0,019) <sup>bc</sup>			
Quebras Cromossômicas	0,010(0,013)	0,300(0,015) <sup>a</sup>	0,130(0,012)	0,150(0,021)	0 <sup>c</sup>	0,020(0,011)	0,040(0,024)	0,080(0,020)			
Total de MN/Q	0,220(0,012)	2,750(0,049) <sup>a</sup>	1,020(0,025)	1,260(0,068) <sup>a</sup>	0,230(0,063)	0,230(0,022)	0,630(0,018)	0,340(0,016) <sup>bc</sup>			
<b>AP/NE</b>											
Células em apoptose	0	0	0	0 <sup>c</sup>	0	0	2,570(0,049) <sup>abc</sup>	0 <sup>c</sup>			
Células em necrose	0	0,060(0,027) <sup>c</sup>	0,050(0,022) <sup>c</sup>	0,460(0,039) <sup>ac</sup>	0,290(0,025) <sup>c</sup>	0,230(0,036)	0,300(0,032)	0,620(0,044) <sup>a</sup>			
Total de AP/NE	0	0,060(0,027) <sup>c</sup>	0,050(0,022) <sup>c</sup>	0,460(0,039) <sup>ac</sup>	0,290(0,025) <sup>c</sup>	0,230(0,036)	2,780(0,055) <sup>abc</sup>	0,620(0,044) <sup>ac</sup>			
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	<b>0,670(0,045)</b>	<b>6,000(0,042)<sup>a</sup></b>	<b>2,770(0,037)</b>	<b>3,620(0,056)</b>	<b>1,660(0,023)</b>	<b>2,200(0,042)</b>	<b>6,010(0,044)<sup>a</sup></b>	<b>3,380(0,039)<sup>c</sup></b>			

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; L. Leveduras associadas ao meio de cultura; L+A50. Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; B+A200. Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10.000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 4.** Frequência (%) de alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações do corante comercial preto, antes e após biodegradação, e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), para o tratamento de recuperação de 72 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura			
			50	200	Associação ao meio de cultura			
					L	L + A50	L + A200	
<b>ACN</b>								
Perdas de material genético	0,190(0,013)	1,190(0,012) <sup>a</sup>	0,370(0,021) <sup>c</sup>	0,690(0,027)	0,020(0,010) <sup>c</sup>	0,150(0,015)	0,190(0,016)	0,250(0,017)
Perdas cromossômicas	0,040(0,014)	0,390(0,012) <sup>ac</sup>	0,140(0,014)	0,130(0,016) <sup>c</sup>	0,020(0,010)	0,110(0,015)	0,260(0,016) <sup>ac</sup>	0,230(0,018)
Aderências cromossômicas	0,070(0,010)	0,090(0,012)	0,270(0,020) <sup>a</sup>	0,220(0,015)	0,080(0,018)	0,040(0,009)	0,230(0,018)	0,350(0,015) <sup>a</sup>
Brotos nucleares	0	0,080(0,015)	0,070(0,013)	0,070(0,021)	0,350(0,022) <sup>a</sup>	0,590(0,025) <sup>a</sup>	0,810(0,031) <sup>abc</sup>	0,680(0,027) <sup>abc</sup>
C-metáfases	0,030(0,010)	0,150(0,018)	0,090(0,010)	0,130(0,015)	0,040(0,010)	0,040(0,009)	0,240(0,020)	0,110(0,016)
Poliploidias (metáfase)	0	0,030(0,012)	0,090(0,014)	0,090(0,025)	0	0	0,260(0,029) <sup>a</sup>	0,040(0,015)
Poliploidias (intérfase)	0	0,080(0,020)	0,120(0,014)	0,160(0,022) <sup>ac</sup>	0,120(0,020)	0,020(0,021)	0,060(0,024) <sup>c</sup>	0,080(0,034) <sup>c</sup>
Pontes cromossômicas	0,010(0,013)	0,110(0,021)	0,080(0,015)	0,130(0,021) <sup>a</sup>	0,040(0,014)	0,060(0,018)	0,070(0,015)	0,110(0,014)
Multipolaridades	0,040(0,012)	0,020(0,015)	0,080(0,016)	0,140(0,022)	0	0,080(0,018)	0,210(0,020)	0,140(0,024)
Binucleadas	0	0,040(0,014) <sup>c</sup>	0,060(0,019)	0,090(0,015)	0	0	0,020(0,015) <sup>c</sup>	0,230(0,014) <sup>ac</sup>
Total de ACN	0,380(0,014)	2,180(0,011) <sup>a</sup>	1,370(0,018)	1,850(0,017) <sup>a</sup>	0,670(0,016) <sup>c</sup>	1,090(0,023)	2,350(0,011) <sup>ac</sup>	2,220(0,013) <sup>ac</sup>
<b>MN/Q</b>								
Micronúcleos	0,250(0,018)	2,060(0,016) <sup>a</sup>	0,500(0,011) <sup>c</sup>	1,040(0,017)	0,040(0,010) <sup>c</sup>	0,190(0,013)	0,410(0,025)	0,680(0,026)
Quebras Cromossômicas	0,010(0,020)	0,130(0,017) <sup>ac</sup>	0,080(0,015)	0,130(0,004) <sup>a</sup>	0,020(0,024)	0,040(0,025)	0,020(0,014)	0 <sup>b</sup>
Total de MN/Q	0,260(0,014)	2,190(0,047) <sup>a</sup>	0,580(0,045) <sup>c</sup>	1,170(0,039) <sup>ac</sup>	0,060(0,009) <sup>c</sup>	0,230(0,017)	0,430(0,030) <sup>c</sup>	0,680(0,026)
<b>AP/NE</b>								
Células em apoptose	0	0,020(0,024)	0,050(0,019)	0,020(0,025)	0	0	0	0 <sup>c</sup>
Células em necrose	0,050(0,034)	0,300(0,019)	0,240(0,026)	0,460(0,033) <sup>a</sup>	0,150(0,024)	0,070(0,028) <sup>c</sup>	0,020(0,036) <sup>c</sup>	0,040(0,031) <sup>bc</sup>
Total de AP/NE	0,050(0,034)	0,320(0,046)	0,290(0,055)	0,480(0,061) <sup>a</sup>	0,150(0,024)	0,070(0,028) <sup>c</sup>	0,020(0,036) <sup>c</sup>	0,040(0,031) <sup>bc</sup>
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>								
	0,690(0,024)	4,690(0,039) <sup>a</sup>	2,240(0,044) <sup>c</sup>	3,500(0,051) <sup>c</sup>	0,880(0,019) <sup>c</sup>	1,390(0,030)	2,800(0,041) <sup>c</sup>	2,940(0,027) <sup>c</sup>

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Leveduras associadas ao meio de cultura; L. Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; L+A200. Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10.000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.



**Tabela 5.** Frequências de MN observados em células F1 de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações do corante comercial preto, antes e após biodegradação, e aos testes controle negativo (água ultrapura) e positivo (MMS), antes e após tratamento de recuperação.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura			Associação ao meio de cultura		
			50	200	L	L + A50	L + A200			
20 horas	0,390(0,069)	9,310(0,072) <sup>a</sup>	5,020(0,061) <sup>a</sup>	5,680(0,057) <sup>a</sup>	0,960(0,070)	1,840(0,055)	3,730(0,052) <sup>a</sup>	4,980(0,051) <sup>a</sup>		
48 horas - rec.	0,290(0,073)	8,070(0,066) <sup>a</sup>	2,060(0,054) <sup>c</sup>	9,380(0,057) <sup>ac</sup>	0,790(0,071)	0,880(0,065) <sup>c</sup>	2,640(0,056) <sup>ac</sup>	3,480(0,055) <sup>ac</sup>		
72 horas - rec.	0,290(0,073)	4,820(0,056) <sup>ac</sup>	1,480(0,062) <sup>c</sup>	5,910(0,054) <sup>a</sup>	0,780(0,088)	0,890(0,066) <sup>c</sup>	1,380(0,062) <sup>c</sup>	1,270(0,060) <sup>bc</sup>		

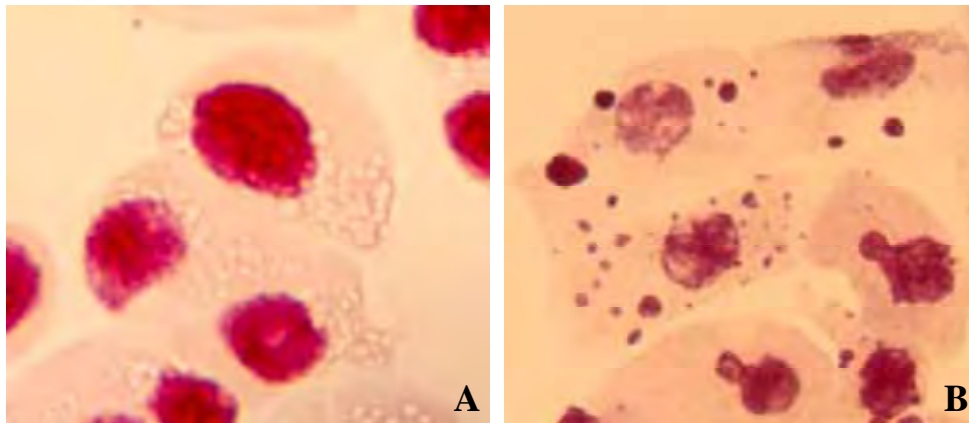
**Nota.** CN: Controle Negativo; **CP.** Controle Positivo; **L.** Leveduras associadas ao meio de cultura; **L+A50.** Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; **L+A200.** Leveduras associadas ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

2.000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

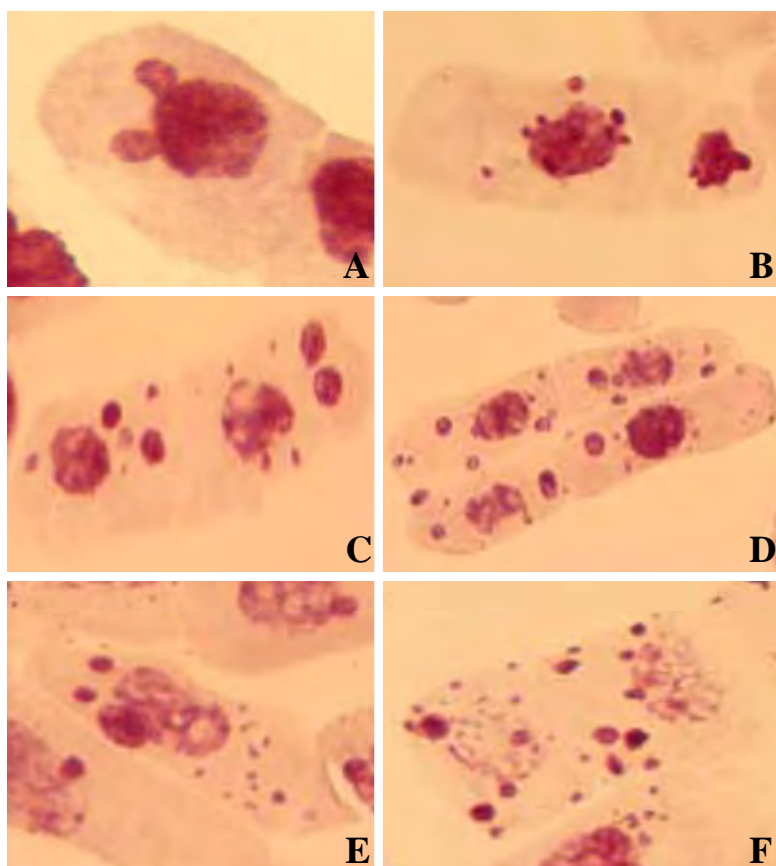
<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.



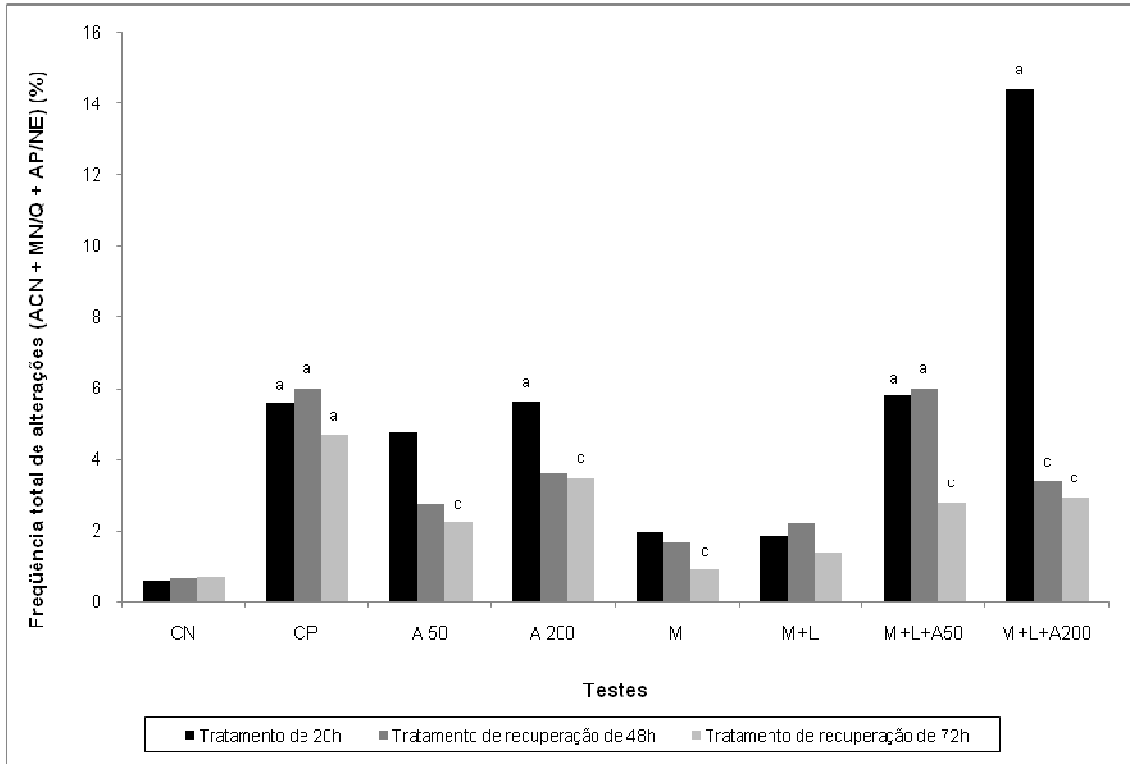
**Figura 1. Danos citotóxicos observados nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* submetidas ao corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), após tratamento com leveduras.**

**A.** Células em necrose; **B.** Células em apoptose.



**Figura 2.** Diferentes morfologias, associadas ao processo de morte celular do tipo apoptótico, observadas nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* submetidas ao corante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), após tratamento com leveduras.

**A-B.** Formação de pequenos brotos nucleares; **C-D.** Excesso de micronúcleos e fragmentação do material genético; **E-F.** Alta fragmentação do material genético.



**Figura 3.** Frequência total de células portadoras de alterações (ACN+MN/Q+AP/NE), antes e após os tratamentos de recuperação.

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal of Applied Toxicology**, v. 13, p. 333-336, 1994.
- AKSU, Z.; DONMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, p. 1075-1083, 2003.
- ALVES DE LIMA, R.O.; BAZO, A.P.; SAVADORI, D.M.F.; RECH, C.M.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research**, v. 626, p. 53-60, 2007.
- ARKHIPCHUK, V.V.; GARANKO, N.N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 187-194, 2002.
- ARLT, V.M.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PAPEL, U.; SORG, B.L.; SCHMEISER, H.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of environmental contaminant 3- nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferases. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1937-1945, 2002.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p.722-725, 2008.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, p. 159-168, 2002.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research**, v. 534, p. 93-99, 2003.
- CHEN, K.C., HUANG, W.T., WU, J.Y.; HOUNG, J-Y. Microbial decolourisation of azo dyes by *Proteus mirabilis*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 686-690, 1999.
- CHUNG, K.T.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes: structure activity relationship. **Mutation Research**, v. 277, p. 201-220, 1992.
- CHUNG, K.T.; STEVENS, J.R. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.
- CLARKE, E.A.; ANLIKER, R. Organic dyes and pigments. In: Hutzinger, O., Editor. The handbook of environmental chemistry, v. 3, part. A. **Anthropogenic Compounds**. Estados Unidos: Sringer-Verlag, 1980. 215 p.
- CONSTANTIN, M.J.; OWENS, E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays – a report of the US EPA's GENETOX Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 1-12, 1982.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* - micronucleus and the *Tradescantia* - micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 167-171, 1999.

DONMEZ, G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 363-366, 2002.

DUKE, R.C.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J.D. Apoptosis. **Scientific American**, v. 3, p. 36-51, 1996.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, New York, v. 8, p. 461-470, 1993.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul**. 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 1999.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, v. 281, p. 89-92, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations. **Mutation Research**, v. 426, p. 107-112, 1999.

GRIFFITHS, J. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed., Oxford, 1984, p. 30.

HIZUME, M.; SATO, S.; TANAKA, A. A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. **Stain Technology**, v. 55, v. 87-90, 1980.

HOLME, I. Ecological aspects of color chemistry. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed. Oxford: Society of Chemistry Industry, 1984, 128 p.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H-G; HAUFMANN, P. Cell death. **Anatomy and Embriology**, Roma, v. 200, p. 11-17, 1999.

JADHAV, J.P.; GOVINDWAR, S.P. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Yeast**, v. 23, p. 315- 323, 2006.

JADHAV, J.P.; PARSHETTI, G.K.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, p. 394-400, 2007.

JEWORSKI, M; HEINZLE, E. Combined chemical-biological treatment of wastewater containing refractory pollutants. **Biotechnology Annual Review**, v. 6, p. 163-196, 2000.

JIANG, J.; GILL, B. S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. **Genome**, v. 36, p. 792-795, 1993.

KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology**, v. 62, p. 64-74, 2001.

KAKUTA, T; AOKI, F.; OKADA, T.; HITOSHI, S.; KIYOSHI, Y.; TAKEO, K. Purification and properties of two different azoreductases from a yeast *Candida curvata* AN723. **Sen'i Gakkaishi**, v. 54, p. 18-25, 1998.

KAMMRADT, P.B. **Remoção de cor de efluentes de tinturarias industriais através de processo de oxidação avançada**. 2004, 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KATAOKA, H.; HAYATSU, T.; HIETSCH, G.; STEINKELLNER, H.; NISHIOKA, S.; NARIMATSU, S.; KNASMULLER, S.; HAYATSU, H. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and A $\alpha$ C) in the water of the Danube River. **Mutation Research**, v. 466, p. 27-35, 2000.

KIM, S.J.; SHODA, M. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 62, p. 114-119, 1999.

KIM, E.S.; PUNINA, E.O.; RODIONOV, A.V. Chromosome CPD (PI/DAPI) – and CMA/DAPI – Banding Patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, p. 392-398, 2002.

KRISCH-VOLDERS, M.; VANDHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 25, p.78, 2002.

KWASNIEWSKA, K. Biodegradation of crystal violet (hexamethyl-p-rosaniline chloride) by oxidative red yeast. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, p. 323-330, 1985.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471- 486. 1938.

LEVINE, W.G. Metabolism of azo dyes: implications for detoxication and activation. **Drug Metab. Rev.**, v. 23, p. 253-309, 1991.

MA, T.H.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MARCANO, L; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

MARTINS, M.A.; CARDOSO, M.H.; QUEIROZ, M.J.; RAMALHO, M.T.; CAMPOS, A.M. Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures. **Chemosphere**, v. 38, p. 2455-2460, 1999.

MARTINS, M.A.; FERREIRA, I.C; SANTOS, I.M.; QUEIROZ M.J.; LIMA N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 91-98, 2001.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MEEHAN, C.; BANAT IM, C.; MCMULLAN, G.; NIGAM, P.; SMYTH, F.; MARCHANT, R. Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Environmentl Int**, v. 26, p. 75-79, 2000.



MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; MARIA, S.S. In: CARVALHO, F.H.; RECCO-PIMENTEL, S.M. (eds.) **A célula** 2001. Brasil: Manole, 2001. 275p.

MIGID, H.M.A.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 57-64, 2007.

MUKAI, Y.; FRIEBE, B.; GILL, B.S. Comparison of C-banding patterns and *in situ* hybridization sites using highly repetitive and total genomic rye DNA probes of 'Imperial' rye chromosomes added to 'Chinese Spring' wheat. **Japanese Journal of Genetics**, v. 67, p. 71-83, 1992.

MURRAY, B.G.; BENNETT, M.D.; HAMMETT, K.R.W. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in situ* hybridization. **Heredity**, v. 68, p. 473-478, 1992.

NONY, C.R.; BOWMAN, M.C.; CAIRNS, T.; LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P. Metabolism studies of an azo dye and pigments in the hamster based on analysis of the urine for the potentially carcinogenic aromatic amines. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 4, p. 132-140, 1980.

ODEGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 126, p. 161-167, 1997.

OHE, T. Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to genotoxicity of river water. **Mutation Research**, v. 393, p. 73-79, 1997.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v. 626, p. 135-142, 2007.

O'NEILL, C; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; LOURENCO, N.D.; PINHEIRO, H.M.; DELÉE W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1009-1018, 1999.

RAFII, F.; HALL, J.D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 35, p. 897-901, 1997.

RAMALHO, P.A.; SCHOLZE, H.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T.; OLIVEIRA-CAMPOS, A.M. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 848-854, 2002.

RAMALHO, P.A.; CARDOSO, M.H.; CAVACO-PAULO, A.; RAMALHO, M.T. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2279-2288, 2004.

RAMALHO, P.A.; PAIVA, S.; CAVACO-PAULO, A.; CASAL, M.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T. Azo reductase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of the plasma membrane ferric reductase. **Applied and Environmental Technology**, v. 71, p. 3882-3888, 2005.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Brasil: ULBRA, 2003. 355p.

ROWLAND, R.E. Chromosome banding and heterochromatin in *Vicia faba*. **Theoretical and Applied Genetics: International Journal of Plant Breeding Research**, v. 60, p. 275-280, 1981.

SHARMA, V.K. **Isolation and characterisation of cellulolytic bacteria from a cattle-waste digester**. 1983, 127f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Aberdeen University, UK, 1983.

SO, K.O.; WONG, P.K.; CHANG, K.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Acetobacter liquefaciens*. **Toxicology Assessment**, v. 5, p. 221-235, 1990.

STIBOROVA, M.; FREI, E.; SCHMEISER, H.H. Comparison of cytochrome P-450 and peroxidase-mediated activations of carcinogenic azo dyes and *N*-nitrosamines. **Gen Physiol. Biophys.**, v. 11, p. 489-498, 1992.

TUNA, M.; VOGEL, K.P.; GILL, K.S.; ARUMUGANATHAN, K. C-banding analysis of *Bromus inermis* genomes. **Crop Science**, v. 44, p. 31-37, 2004.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4-14, 2007.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

VIEIRA, S. **Bioestatística – Tópicos Avançados, Testes não paramétricos, tabelas de contingência e análise de regressão**. 1 ed., Rio de Janeiro: Editora Campus, 2004, p. 23-27.

VITOR, V. **Emprego da linhagem selvagem de *Candida albicans* isolada de efluente industrial para a avaliação da biosorção/biodegradação do corante azóico “Direct Violet 51”**. 2005, 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

WONG, P.K.; YUEN, P.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. **Water Research**, v. 30, p. 1736-1744, 1996.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 109-114, 2003.

**“CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO AZOCORANTE BDCP (BLACK DYE COMMERCIAL PRODUCT) SOBRE CÉLULAS DE *Allium cepa*, ANTES E APÓS TRATAMENTO DE BIODEGRADAÇÃO PELO FUNGO BASIDIOMICETO *Phanerochaete chrysosporium*”**

**RESUMO**

Foram avaliados os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de duas concentrações (50 e 200 µg/L) de um azocorante comercial preto (BDCP - Black Dye Commercial Product), antes e após biodegradação pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, usando a técnica citogenética de coloração convencional e de bandamento AgRON em células de *A. cepa*. Foram registradas frequências significativas de diminuição de índices mitóticos; analisadas as frequências de células em processo de morte, de aberrações cromossômicas, de micronúcleos, de quebras cromossômicas e de variação no número de nucléolos em células de *Allium cepa* expostas ao corante, antes e após biodegradação fúngica. A maior concentração testada do BDCP (200µg/L) apresentou um potencial citotóxico mais evidente, quando biodegradado pelo microorganismo *Phanerochaete chrysosporium*. A diminuição significativa na frequência de células meristemáticas danificadas, após o tratamento de recuperação de 72 horas, para os ensaios realizados com a concentração de 50 µg/L biodegradada pelo fungo, indica que o azocorante, nesta concentração, não tem efeito acumulativo sobre as células de *A. cepa*. Pelos resultados observados para a maior concentração biodegradada do azocorante, podemos inferir que os metabólitos, derivados da ação fúngica desta concentração, são altamente tóxicos para o organismo-teste *A. cepa*.

*Palavras-chave:* *Allium cepa*, aberrações cromossômicas, bandamento AgRON, azocorante BDCP, metabólitos de azocorante, biodegradação por microrganismo.

## INTRODUÇÃO

Os azocorantes, compostos químicos caracterizados por um ou mais grupamentos azo ( $-N=N-$ ) ligados a sistemas aromáticos, constituem uma das principais classes de poluentes ambientais, e perfaz um total de 60 a 70% de todos os corantes utilizados no mundo (ZOLLINGER, 1987; HOUK, 1992; CARLIELL et al., 1995). A emissão destes azocorantes no ambiente pode interferir esteticamente no meio, por colorir ambientes aquáticos naturais, mesmo em baixas concentrações, além de causar outros impactos negativos aos organismos, devido à toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, tanto pelos efeitos do próprio corante como pelos produtos de sua biotransformação (CLARKE; ANLIKER, 1980; REID et al. 1984; ROSENKRANZ; KLOPMAN, 1989; ROSENKRANZ; KLOPMAN, 1990; CHUNG; CERNIGLIA, 1992; CHUNG; STEVENS, 1993; KAMMRADT, 2004; UMBUZEIRO et al., 2005; TSUBOY et al., 2007).

Estudos com diferentes organismos têm associado o aparecimento de alterações celulares e genéticas à exposição aos azocorantes. Rajaguru et al. (1999) demonstraram que o corante Direct Red 2 é capaz de induzir a formação de micronúcleos em células de medula óssea de ratos, dados estes corroborados por Matsuoka et al. (2001), que mostraram que alguns azocorantes, além de serem capazes de originar micronúcleos em hamsters, também induziram núcleos multilobulados e células binucleadas nestes organismos. Estudos realizados por Tsuda et al. (2000) com vários azocorantes, apontam que estes corantes induzem a fragmentação do DNA de células de diferentes órgãos de ratos. Avaliações feitas por Al-Sabti (2000) comprovaram a mutagenicidade do corante Chlorotriazine Reactive Azo Red 120, pela indução de altas taxas de micronúcleos em eritrócitos de peixes. Fonseca (2006) mostrou que muitos azocorantes provocam alterações morfológicas em protozoários da espécie *Tetrahymena pyriformis*. A mutagenicidade do corante comercial preto (BDCP – Black Dye Commercial Product) foi comprovada por meio de bioensaios realizados com *Salmonella* (UMBUZEIRO et al., 2005) e com *Allium cepa* (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008) e a sua carcinogenicidade foi comprovada pelos experimentos de indução de criptas aberrantes em ratos (ALVES DE LIMA et al., 2007).

Para diminuir ou neutralizar os problemas de contaminação por azocorantes, há uma grande necessidade de que os efluentes têxteis sejam eficazmente tratados, antes de serem liberados aos corpos aquáticos. Uma metodologia que pode constituir um bom instrumento de

despoluição da água é a técnica de degradação biológica. Porém, para o sucesso e eficiência do uso de técnicas de biodegradação, é preciso avaliar quais microorganismos são, realmente, eficientes para degradar e remover, completamente, os corantes (MARTINS et al., 2001; KUNZ et al., 2002). Um dos microorganismos mais utilizados para biodegradar poluentes recalcitrantes, como os azocorantes, é o fungo *Phanerochaete chrysosporium* (CRIPPS et al., 1990; SPADARO et al., 1992; GOSZCZYNSKI et al., 1994; AZMI et al., 1998; MARTINS et al., 2001; WESENBERG et al., 2003; CAMPOS, 2004). Esta espécie produz enzimas lignolíticas extracelulares, que têm sido associadas à degradação de azocorantes. Um dos mecanismos utilizados pelo *P. chrysosporium* para degradar os azocorantes é a clivagem redutiva das ligações azo destes compostos químicos (JESUS, 2005). No entanto, as vias bioquímicas envolvidas nos processos de biodegradação por este fungo ainda não estão completamente esclarecidas (MARTINS et al., 2001; WESENBERG et al., 2003; ZHAO et al., 2006).

Ensaio citogenéticos são úteis para identificar os efeitos perigosos de substâncias químicas em diferentes concentrações e tempos de exposição, sendo importantes testes para avaliar a influência de diferentes poluentes ambientais sobre os organismos (RAO, 1989; DE SERRES, 1992). Um dos organismos-teste que tem se mostrado muito eficiente para estudos de toxicologia ambiental, envolvendo o uso de testes citogenéticos, é a espécie *Allium cepa*. Os ensaios de aberrações cromossômicas com *A. cepa* têm sido considerados uma eficiente ferramenta de avaliação de poluentes aquáticos (GRANT, 1982; CONSTANTIN; OWENS, 1982; SHARMA, 1983; FISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; GRANT, 1994, 1999; COTELLE et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2006; MIGID et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; FERNANDES et al., 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009), tendo merecido especial destaque entre os testes recomendados para avaliação de agentes genotóxicos (MATEUCA et al., 2006). A mutagenicidade de determinadas concentrações de amostras ambientais, derivadas de efluentes industriais contaminados pelo corante comercial preto BDCP (Black Dye Commercial Product) e outros poluentes, foi comprovada por Caritá e Marin-Morales (2008), por meio do ensaio de aberrações cromossômicas em *A. cepa*.

A coloração com o nitrato de prata é uma técnica de coloração cromossômica que pode ser utilizada para identificar o número de nucléolos e os possíveis sítios ativos da RON em diferentes espécies vegetais (MURRAY et al., 1992; CARVALHO; GUERRA, 2002). A

posição das RONS auxilia na melhor compreensão dos eventos de alterações cromossômicas que se estabeleceram em cada cariótipo. Arkhipchuk e Garanko (2002) tem utilizado a técnica de bandamento AgRON em *A. cepa*, para avaliação de poluentes ambientais, por meio da análise da quantidade e do volume de nucléolos por célula. Çavas e Ergene-Gözükkara (2003) indicaram que mudanças na quantidade de nucléolos são importantes parâmetros a serem usados na avaliação de efeitos genotóxicos de poluentes aquáticos.

O presente estudo teve o objetivo de avaliar o potencial de indução de danos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do corante comercial BDCP, antes e após biodegradação pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, usando as técnicas citogenéticas de coloração convencional e impregnação por nitrato de prata, em células radiculares de *A. cepa*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi avaliado neste trabalho o efeito celular do azocorante BDCP, que é um corante comercial composto por 3 corantes pertencentes ao grupo dos nitro-aminoazobenzenos: C.I. Disperse Blue 373 ( $C_{21}H_{21}BrN_6O_6$ ; CAS n° 51868-46-3), C.I. Disperse Violet 93 ( $C_{18}H_{19}BrN_6O_5$ ; CAS n° 268221-71-2) e C.I. Disperse Orange 37 ( $C_{17}H_{15}Cl_2N_5O_2$ ; CAS n° 13301-61-6) (UMBUZEIRO et al., 2005).

No presente estudo, foram avaliadas duas concentrações do BDCP (200 µg/L e 50 µg/L), determinadas previamente por testes-piloto e obtidas após a realização de sucessivas diluições do produto comercial em água ultrapura.

Como organismo-teste, foram utilizadas sementes de *A. cepa* (Asparaginales: Alliaceae) de uma única variedade (baia periforme), ou seja, geneticamente e fisiologicamente homogêneas, a fim de evitar diferentes respostas nas várias fases de execuções experimentais

O tratamento de biodegradação do corante comercial preto foi feito com o fungo *P. chrysosporium*, em meio de cultura líquida Sabouraud. Os microorganismos foram previamente incubados em estufa a 28 °C, por 3 dias. Em seguida, foram realizados os testes de biodegradação, em duplicata, em tubos de ensaios esterilizados, onde o volume final de cada tubo foi de 10 mL, como descrito a seguir:

- *Testes Controle:*

CN (Controle Negativo): 10 mL de água ultrapura;

Testes Branco: Branco 1: 8,0 mL de meio de cultura + 2,0 mL de água destilada; Branco 2: 8,0 mL de meio de cultura + uma alça de fungos + 2,0 ml de água destilada;

CP (Controle Positivo): 10 mL de  $9 \times 10^{-5}$  M de metilmetanosulfonato – MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3.

- *Testes com o corante comercial preto:*

Concentração de 50 µg/L: 8,0 mL de meio de cultura + uma alça de fungos + 1,5 mL de água destilada + 0,5 mL do da solução estoque de 100 mg/L do azocorante; Concentração de 200 µg/L: 8,0 mL de meio de cultura + uma alça de fungos + 2,0 mL da solução estoque de 100 mg/L do azocorante.

Foi realizada uma nova incubação dos microorganismos, em estufa, por mais 4 dias (período em que os microorganismos atingiram um crescimento ótimo), na temperatura de 28 °C. Posteriormente, os tubos foram levados à autoclave a 1 atm, por 10 minutos. Após obtenção das amostras das concentrações do corante biorremediadas, foram realizados, em duplicata, os ensaios de germinação das sementes de *A. cepa*.

A germinação das sementes de *A. cepa* ocorreu em placas de Petri cobertas com papel de filtro embebido em água ultrapura, temperatura ambiente de  $21 \pm 4$  °C. Quando as raízes atingiram, cerca de 1,5 cm de comprimento (5 dias após o início dos experimentos), elas foram transferidas para outras placas de Petri contendo as concentrações de 200 µg/L e 50 µg/L do azocorante (amostras com e sem tratamento de biodegradação por fungos) e com os testes controle negativo (CN, branco 1 e branco 2) e positivo (CP), permanecendo, separadamente, nessas placas por um período de 20 horas. Após este período, foram coletadas algumas raízes de cada uma das placas. O restante das raízes foi transferido para placas contendo água ultrapura, para um tratamento de recuperação por um período de 48 e 72 horas, quando novas coletas de raízes foram realizadas, para cada um dos períodos de recuperação.

Todas as raízes coletadas (no tratamento de 20 horas e nos tratamentos de recuperação de 48 e 72 horas) foram fixadas em solução de Carnoy (Álcool-Ácido Acético 3:1 – v/v) por 18 horas, em T.A. Após esse período, estas raízes foram transferidas para uma nova solução de Carnoy, onde foram conservadas em refrigerador, até a sua utilização na confecção das lâminas de coloração convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares) e de bandamento AgRON.

Para o ensaio de coloração convencional (ensaio de aberrações cromossômicas e nucleares), as raízes fixadas foram coradas pela reação de Feulgen, como descrito por Feulgen

e Rossenbeck, apud Mello e Vidal (1978). Após a coloração com o reativo de Schiff, as regiões meristemáticas das raízes foram cobertas com lamínula e, suavemente, esmagadas em uma gota de solução de carmim acético a 2%. A remoção das lamínulas ocorreu em nitrogênio líquido e a montagem das lâminas foi feita em resina sintética (Mounting Media, Permout®, Fisher Scientific). As lâminas foram, então, analisadas em microscopia de luz, sendo visualizados vários tipos de alterações nas células meristemáticas de *A. cepa*. Dentre as alterações celulares observadas, as perdas de material genético, aderências cromossômicas, C-metáfases, pontes cromossômicas, multipolaridades, poliploidias, brotos nucleares e células binucleadas foram agrupadas na categoria de aberrações cromossômicas e nucleares (ACN), sendo consideradas como um *endpoint* de genotoxicidade. Os micronúcleos e as quebras cromossômicas (MN/Q) foram avaliados separadamente das ACN, sendo considerados como um *endpoint* de mutagenicidade. As células apoptóticas e necróticas (AP/NE) foram agrupadas em outra categoria, consideradas como um *endpoint* de citotoxicidade. O Índice Mitótico (IM), ou seja, a relação do número de células em divisão sobre o total de células analisadas, foi mais um parâmetro analisado, também indicativo de citotoxicidade. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, contabilizando um total de 10.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 20 lâminas (10 lâminas para cada repetição).

Foram confeccionadas lâminas das regiões não meristemáticas das raízes de *A. cepa*, retirando cerca de 1 mm acima da região meristemática radicular, para analisar as frequências de MN em células F<sub>1</sub>, seguindo o protocolo descrito por Ma et al. (1995). Para o preparo dessas lâminas, as raízes foram coradas pela reação de Feulgen, as regiões não meristemáticas foram cortadas, cobertas com lamínula e esmagadas, suavemente, em uma gota de solução de carmim acético a 2 %. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em resina sintética. Todos estes experimentos foram realizados em duplicata, contabilizando um total de 2.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 200 células por lâmina, compreendendo um total de 10 lâminas (5 lâminas para cada bateria de experimentos).

Para confeccionar as lâminas destinadas à técnica de impregnação por nitrato de prata, foi feito um tratamento prévio dos meristemas radiculares em solução enzimática de celulase/pectinase (2:20 – v/v), por 60 minutos, seguido de um banho de 2 minutos em água destilada. Os experimentos de bandamento AgRON foram realizados de acordo com o



protocolo descrito por Hizume et al. (1980). As lâminas foram montadas em resina sintética e analisadas em microscópio de luz. Foi quantificado o número de nucléolos por célula, comparando os diferentes testes e tratamentos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e foi contabilizado um total de 10.000 células por concentração testada e por tratamento (20, 48 e 72 horas), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 20 lâminas (10 lâminas para cada repetição).

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis ou teste H (VIEIRA, 2004), aceitando a probabilidade de 0,05 para indicar um efeito significativo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Um método muito utilizado para a análise da citotoxicidade de substâncias químicas em estudos de toxicologia ambiental é a análise da variação dos índices mitóticos (IM). Uma substância tóxica pode alterar os IM dos organismos a ela expostos, e, com isso, alterar a fisiologia normal deste organismo. Se os IM forem diminuídos significativamente, o organismo pode apresentar problemas de crescimento e/ou de regeneração, enquanto que, se os índices forem aumentados de forma acentuada, pode também desencadear processos de tumorização, caracterizando um grande comprometimento para o organismo como um todo (SMAKA-KINCL ET AL., 1997; MARCANO ET AL., 2004). Desta forma, a análise do IM, segundo Fernandes et al. (2007), é uma importante ferramenta para a avaliação da ação tóxica de poluentes ambientais sobre os organismos a eles expostos.

Exposições de *A. cepa* a duas concentrações do azocorante BDCP, antes e após biodegradação pelo fungo *P. chrysosporium*, mostraram que, para o tratamento de 20 h, o azocorante não se apresentou citotóxico para o organismo teste utilizado. Contudo, foram observadas frequências significativas de alterações no IM para as células tratadas com o meio de cultura, com e sem o fungo (branco 1 e 2 – Tabela 1) e com as duas concentrações do corante biodegradado pelo fungo, quando comparados com os resultados do controle negativo. Embora os resultados encontrados para o tratamento de 20 h com o corante biodegradado tenha sido significativo, em relação ao controle, atribuímos esta diferença ao próprio meio de cultura, pois os resultados registrados para o meio e para os testes com o corante biodegradado foram semelhantes, o que é um forte indicativo da citotoxicidade do próprio meio de cultura (Tabela 1). Todos os resultados obtidos para os ensaios de

recuperação (48 h e 72 h) indicam que tanto o azocorante como os metabólitos formados pela degradação pelo fungo apresentam-se citotóxicos para as células meristemáticas de *A. cepa* (Tabela 1). As frequências observadas para os tratamentos de recuperação com o azocorante biodegradado foram maiores que as dos testes com o meio de cultura, mostrando um efeito adicional dos metabólitos. Estes resultados, de acordo com a discussão acima, indicam uma citotoxicidade tanto do azocorante como dos metabólitos derivados da degradação fúngica sobre as células de *A. cepa*. Possivelmente, estes compostos, quando dentro das células, passam ainda por outras biotransformações, que convertem estas substâncias em compostos ainda mais potentes na toxicidade, o que confere um efeito citotóxico adicional para a célula.

Outro parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a citotoxicidade de poluentes ambientais é a análise das frequências de morte celular decorrente da exposição de organismos a compostos químicos. As frequências significativas de células necróticas, observadas nos testes com o azocorante biodegradado, tratamento de 20 horas (Tabela 2), demonstram que este químico e, principalmente, seus metabólitos são altamente tóxicos para as células meristemáticas de *A. cepa*. Estes dados de citotoxicidade são concordantes com os resultados de IM, comprovando assim a ação citotóxica do corante, após recuperação e biodegradação.

Além disso, as altas e significativas frequências de células apoptóticas, verificadas para os tratamentos de 20 e 72 horas com a maior concentração do azocorante, após biodegradação pelo fungo, demonstram que, nestas condições, o azocorante teve uma ação citotóxica maior sobre o organismo-teste, promovendo danos ainda mais sérios que os observados pela exposição ao produto original (Tabelas 2, 3 e 4).

Duke et al. (1996) afirmaram que a morte celular tem um papel importante na eliminação de células malignas ou que perderam a função no organismo. Assim, podemos inferir que a indução de morte celular, após a exposição do organismo-teste *A. cepa* aos subprodutos da biodegradação da concentração mais alta do BDCP, tem um efeito positivo sobre o organismo, pois estaria eliminando as células que, eventualmente, poderiam inviabilizar o indivíduo como um todo, dando então a possibilidade destas células alteradas serem substituídas por células metabolicamente mais eficientes. Adicionalmente, a redução nas frequências de morte celular, constatada após a aplicação dos tratamentos de recuperação (Tabelas 3 e 4), com exceção do teste com a concentração de 200 µg/L biodegradada pelo fungos (tratamento de 72 horas), indica que o azocorante não é acumulativo na célula e pode

ter a sua ação neutralizada, quando o organismo deixa de se expor a este químico, como observado nos testes com menor concentração testada tanto do azocorante como de seus metabólitos e pela maior concentração não biodegradada pelo fungos.

As significativas frequências de ACN, observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos diferentes testes e tratamentos com o azocorante (Tabelas 2 a 4), demonstram que o BDCP é potencialmente genotóxico para este organismo-teste. Estes resultados corroboram os estudos realizados por Caritá e Marin-Morales (2008), que verificaram a indução de aberrações cromossômicas em células de *A. cepa* expostas a amostra de água de um rio receptor de efluente de uma indústria têxtil que utilizava o mesmo corante comercial preto estudado no presente estudo. As maiores e significativas frequências de ACN observadas neste trabalho, para todos os tratamentos realizados com o azocorante biodegradado (Tabelas 2 a 4) indicam que os produtos da degradação do corante pelo *P. chrysosporium* são mais genotóxicos que o próprio azocorante, sendo que os maiores danos foram proporcionados pela maior concentração testada. De acordo com Cripps et al. (1990) e Wesenberg et al. (2003), o *P. chrysosporium* é a espécie de fungo mais utilizada na degradação de azocorantes, pois possui enzimas lignolíticas extracelulares associadas à clivagem redutiva da ligação azo desses compostos químicos. No entanto, Chung e Cerniglia (1992); Bell et al. (2000), afirmam que a quebra da referida ligação química produz aminas aromáticas, substâncias estas, em sua maioria, altamente tóxicas às células. Além disso, estudos realizados por Zhao et al. (2006) mostraram que a degradação de azocorantes por fungos basidiomicetos também pode se dar por diferentes mecanismos oxidativos, que formam, inclusive, outros produtos além das aminas aromáticas, que são potencialmente tóxicos para as células. Todos esses produtos de degradação têm potencial genotóxico ou até mutagênico, pois podem reagir com a molécula de DNA, danificando-a (BARTSCH, 1981; ARLT et al., 2002) e impedindo que ocorra a duplicação e o reparo do material genético durante a intérfase (LEVINE, 1991).

As frequências de ACN, registradas nos testes com o azocorante e seus metabólitos, embora significativas para todos os tratamentos em relação ao controle negativo, mostraram um potencial decréscimo da ação do corante, após os tratamentos de recuperação de 48 e 72 h (Tabelas 3 e 4). Esta diminuição dos índices de ACN pode ser devido a uma diminuição na concentração do corante dentro da célula, após o período de recuperação, ou ainda a uma

eliminação (morte) das células afetadas pelo corante, onde as células saudáveis acabam por recuperar o tecido injuriado.

Foram observados vários tipos de ACN induzidas pelo azocorante e seus metabólitos, sendo que as maiores frequências registradas foram para os ensaios após exposição à maior concentração do corante biodegradado pelo fungo, o que comprovou uma relação positiva de dose-resposta para os efeitos genotóxicos destes compostos (Tabelas 2 a 4).

De maneira geral, foi observado para o tratamento de 20 horas, concentração de 200 µg/L do corante biodegradado, frequências significativas de quase todos os tipos de ACN, como perdas, pontes e aderências cromossômicas, brotos nucleares, c-metáfases, células poliplóides, células multipolares e binucleadas (Tabela 2), o que comprovou uma ação genotóxica bastante evidente para os metabólitos do azocorante testado. Enquanto os valores significativos de perdas de material genético na prófase parecem ser um dos tipos de ACN mais associado à ação do azocorante original, os brotos nucleares, as células poliplóides, multipolares e binucleadas são as ACN, preferencialmente, induzidas pelos produtos derivados da biodegradação do corante pelo fungo. Estas alterações foram observadas em todos os tratamentos realizados (Tabelas 2 a 4), inclusive exibindo frequências significativas, até mesmo após o tratamento de recuperação de 48 horas em água ultrapura (Tabela 3).

Além de poliploidias, brotos nucleares e células binucleadas, observadas nos tratamentos de 20 e 48 horas com a concentração de 200 µg/L do corante biodegradado (Tabelas 2 e 3), as frequências significativas de perdas cromossômicas, observadas no tratamento de 20 horas com a concentração de 200 µg/L, com e sem biodegradação (Tabela 2), sugerem que o corante BDCP e seus metabólitos têm ação sobre os fusos mitóticos das células. A presença destas células poliplóides e das perdas cromossômicas, segundo Fernandes et al. (2007, 2009), são decorrentes de exposições celulares a compostos aneugênicos, que atuam sobre as tubulinas dos fusos mitóticos, impedindo a sua perfeita polimerização. Desta forma, a placa metafásica não se estabelece e tampouco ocorre a segregação cromossômica correta para os pólos das células (FISKESJÖ, 1985 e 1993). Como as substâncias aneugênicas agem com maior eficiência sobre os microtúbulos provisórios (fusos mitóticos) e não sobre os microtúbulos do centro organizador de microtúbulos (COM), poderá haver uma duplicação dos COM sem haver a divisão do núcleo da célula. Esta paralisação em metáfase leva à formação de células poliplóides, conforme descrito por Fernandes et al., 2007 e 2009. Ainda segundo estes autores, se houver a interrupção da

exposição celular ao agente aneugênico, as divisões subseqüentes poderão acontecer normalmente. Porém, como já foram estabelecidos mais de dois COMs, os cromossomos poderão migrar para mais de dois pólos, caracterizando alterações celulares do tipo anáfases multipolares.

Como foi observado nos diversos testes realizados, os metabólitos do azocorante apresentam uma ação genotóxica, que atribuímos a uma provável presença de amins aromáticas e de nitroanilinas formadas no processo de biodegradação fúngica, substâncias estas que devem ter uma ação microtúbulo despolimerizante (ação aneugênica), o que confere um efeito ainda mais danoso a estes subprodutos, quando comparados com o efeito do próprio corante.

A presença de c-metáfases em frequências significativas para a maior concentração do azocorante biodegradado e não biodegradado por fungos, tratamento de 20 horas (Tabela 2), também indica uma ação aneugênica, tanto do azocorante como dos seus metabólitos. A presença dessa anormalidade pode explicar, ainda, as significativas frequências de células metafásicas poliplóides induzidas pelo azocorante e de células poliplóides e binucleadas, observadas nas raízes expostas aos testes com o azocorante biodegradado (Tabela 2). Estes dados corroboram estudos de Fiskesjö (1985), Odeigah et al. (1997) e Krisch-Volders et al. (2002), que afirmam que células poliplóides e células binucleadas podem ser originadas de ACN do tipo c-metáfases.

Segundo Fernandes et al (2007), brotos nucleares podem ser causados por eventos de poliploidização, por apresentar material genético excedente ao conteúdo normal de um núcleo diplóide. O material excedente pode ter uma migração contínua, até que ele seja completamente expulso do núcleo, formando, no citoplasma, os micronúcleos. A expulsão de material genético excedente foi também observada em linfócitos humanos por Leach e Jackson-Cook (2004).

No tratamento de 20 horas, antes e após degradação por fungos, houve uma indução significativa de células com aderências cromossômicas (Tabela 2). Estas alterações são decorrentes de uma não migração cromossômica para os pólos da célula, o que promove o estacionamento da divisão celular em metáfase e uma contínua condensação dos seus cromossomos. Segundo Marcano et al. (2004) e Türkoglu (2007), as aderências podem conferir danos drásticos às células, muitas vezes de caráter irreversíveis, levando-as a

processos de morte, como o observado nas análises realizadas com o azocorante e os metabólitos de degradação do BDCP (Tabelas 2 a 4).

Já as pontes cromossômicas, observadas nos testes com o azocorante, tanto na presença de fungo como na ausência dele (Tabelas 2 a 4), podem ser resultantes de aderências cromossômicas, conforme descrito por Giacomelli (1999) e Marcano et al. (2004), ou de terminações cromossômicas coesivas ou rearranjos estruturais (FISKESJÖ, 1993).

A mutagenicidade do azocorante e dos produtos gerados pela degradação deste composto químico pelos fungos da espécie *P. chrysosporium* foi demonstrada pela presença de MN/Q, em células meristemáticas, e de MN nas células F<sub>1</sub> das raízes de *A. cepa* expostas ao azocorante (Tabelas 2 a 5). As frequências significativas de MN/Q observadas nas células meristemáticas expostas ao teste com a concentração de 50 µg/L do azocorante (tratamento de 20 horas), aos testes com concentração de 200 µg/L do azocorante (tratamentos de 20, 48 e 72 horas) e ao teste com a concentração de 200 µg/L do azocorante biodegradada por fungos (tratamento de 72 horas) mostram que o azocorante e seus metabólitos são mutagênicos nessas concentrações e tratamentos, tendo sido verificados que os maiores efeitos mutagênicos foram causados pelo próprio azocorante e não pelos metabólitos formados pela degradação fúngica (Tabelas 2 a 4). Houve uma redução significativa nas frequências de MN/Q das células expostas à concentração de 50 µg/L, antes e após biodegradação pelo fungo, para os tratamentos de recuperação de 48 e de 72 horas, o que sugere que esse químico e seus subprodutos, nessa concentração, podem ter sua ação mutagênica diminuída, após a interrupção da exposição das raízes de *A. cepa* à sua ação (Tabelas 3 e 4). Entretanto, a presença significativa de micronúcleos e de quebras cromossômicas, observada nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas à concentração mais alta do azocorante biodegradado, após o tratamento de 72 horas (Tabela 4), indica que, apesar de ter sido interrompida a exposição das raízes de *A. cepa* ao azocorante, houve, para esta concentração, uma ação mutagênica aumentada, tanto do corante como dos seus metabólitos.

Leme e Marin-Morales (2008) afirmam que células meristemáticas de *A. cepa* portadoras de ACN podem progredir para células F<sub>1</sub> (não meristemáticas) micronucleadas. Segundo Ribeiro (2003), as células micronucleadas são resultantes de danos ocorridos nas células parentais, que foram reparados erradamente ou mesmo não reparados pelas células. Portanto, a presença de frequências significativas de MN em células F<sub>1</sub>, observada após exposição das raízes de *A. cepa* aos testes com o azocorante, antes e após biodegradação por

fungos, confirmam os resultados anteriores da ação genotóxica e mutagênica do BDCP e dos produtos gerados pela sua biodegradação por *P. chrysosporium* (Tabela 5). Tratamentos de recuperação de 48 horas foram eficientes para reduzir as frequências de MN nas células F<sub>1</sub>, após exposição das mesmas à concentração de 50 µg/L. O tratamento de recuperação de 72 horas mostrou-se, para esta concentração, igualmente eficaz na promoção de decréscimos significativos das frequências de MN (Tabela 5). Por outro lado, em todos os tratamentos, houve a permanência de altos e significativos valores de MN nas células F<sub>1</sub> expostas à concentração de 200 µg/L (Tabela 5), demonstrando uma acumulativa e forte ação mutagênica dessa concentração do azocorante, mesmo quando as condições normais de exposição das raízes foram restauradas. A dosagem de 200 µg/L, utilizada neste estudo, é considerada bastante próxima às verificadas em amostras ambientais estudadas por Oliveira et al. (2007).

Analisando os resultados referentes ao total de anormalidades celulares (ACN, MN/Q e AP/NE) exibido pelas células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das raízes ao azocorante, antes e após biodegradação por fungos, tratamento de 20 horas (Tabela 2; Figura 1), pôde-se constatar que, quanto maior a concentração do corante BDCP maior é o seu potencial citotóxico, caracterizando uma relação positiva de dose-resposta do organismo-teste *A. cepa*. Também foi observado que o corante apresenta uma maior toxicidade quando passa por processo de biodegradação pelo fungo *P. chrysosporium*, comprovando que os produtos da biodegradação do azocorante, provavelmente as aminas aromáticas e as nitroanilinas, causam danos mais drásticos ao organismo do que o composto químico original. A diminuição significativa de alterações celulares, após o tratamento de recuperação de 72 horas, na frequência total de células meristemáticas danificadas, após biodegradação do azocorante pelo fungo, para a concentração de 50 µg/L (Tabela 4), indica que o corante não mantém seu potencial tóxico para as células, quando são restabelecidas as condições normais de exposição das raízes em água. O mesmo não se pode afirmar com relação aos danos provocados pela concentração biodegradada de 200 µg/L, pois foram verificadas frequências significativas de anormalidades celulares nos tratamentos de 20 e 72 horas (Tabelas 2 e 4), indicando que os produtos da biodegradação dessa concentração do azocorante são altamente tóxicos ao organismo-teste. Esses resultados são concordantes com as citações de Chung (1983), Cripps et al. (1990), Chung e Cerniglia (1992), Bell et al., (2000) e Ramalho (2005), que afirmaram que os produtos gerados pela degradação microbiana de azocorantes podem

causar efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos sobre organismos expostos, podendo ser até mais perigosos que o próprio azocorante.

As grandes variações no número e no tamanho dos nucléolos das células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao azocorante, antes e após tratamento de biodegradação fúngica (Tabelas 6 a 8), demonstram a genotoxicidade tanto do corante como de seus metabólitos. Estes dados são concordantes com as citações de Arkhipchuk et al. (2000) e Çavas e Ergene-Gözükara (2003), que mostraram uma variação no número de nucléolos em células de plantas e animais associada à ação genotóxica de poluentes ambientais. A variação no número de nucléolos das células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das raízes ao azocorante, tratamento de 20 horas, (Tabela 6), mostraram que a concentração de 200 µg/L do azocorante biodegradado foi genotóxica, pois foi observado um aumento significativo de células com seis nucléolos, além de induzir também células com sete nucléolos. Os efeitos do azocorante sobre as células a ele expostas foi significativamente maior para a maior concentração testada, após passar pela biodegradação pelo fungo *P. chrysosporium* (Tabela 6).

Se por um lado, os tratamentos de recuperação de 48 e 72 horas se mostraram eficientes na minimização dos danos genotóxicos causados pelos metabólitos derivados da biodegradação do azocorante pelo fungo basidiomiceto *P. chrysosporium*, por exibirem menores frequências de células com 5, 6 e 7 nucléolos (Tabelas 7 e 8), os tratamentos de recuperação não apresentaram eficácia para reduzir os danos genotóxicos provocados pelo corante não biodegradado. Foi verificado um aumento significativo de células com 5 nucléolos, para os dois tratamentos de recuperação, um aumento significativo de células com 6 nucléolos para o tratamento de 48 horas, a persistência de células com 7 nucléolos para os dois tratamentos de 48 e 72 horas, bem como a presença de células com 8 nucléolos, após o tratamento de 72 horas realizado com a concentração de 50 µg/L do azocorante (Tabelas 7 e 8).

## **CONCLUSÃO**

O presente estudo mostrou que o corante comercial preto BDCP, tanto antes como após biorremediação pelo fungo *P. chrysosporium*, é potencialmente citotóxico, genotóxico e mutagênico para o organismo-teste *A. cepa*, pois provocou alterações nos índices mitóticos,



induziu morte celular por necrose e apoptose, causou variação no número de nucléolos por célula, aberrações cromossômicas e nucleares, bem como micronúcleos e quebras cromossômicas.

Pelos estudos realizados, pôde-se comprovar que o azocorante apresenta um maior potencial tóxico às células de *A. cepa*, quando biodegradado pelo fungo *P. chrysosporium*, corroborando estudos já realizados anteriormente com outros microorganismos (bactérias heterotróficas e a levedura *Candida viswanathii*), o que comprova que a biodegradação deste azocorante produz metabólitos potencialmente mais tóxicos que o próprio azocorante BDCP.

Os tratamentos de recuperação foram eficientes para reduzir os danos induzidos pelo corante original e para a concentração de 50 µg/L biodegradada pelo fungo, porém, no caso da concentração de 200 µg/L biodegradada pelos fungos basidiomicetos, nem o tratamento de recuperação de 72 horas demonstrou eficácia para minimizar as alterações cromossômicas e celulares registradas no tratamento de 20h. Estes resultados indicam que o descarte de azocorante no meio ambiente caracteriza-se em um impacto ambiental bastante comprometedor, tendo em vista os riscos diretos e indiretos que eles podem promover sobre toda a biota relacionada aos locais impactados.

#### **AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem à Professora Gisela de Aragão Umbuzeiro, da CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, pelo fornecimento do BDCP (Black Dye Commercial Product).

**Tabela 1.** Índices Mitóticos (I.M.) observados nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de seus metabólitos, antes e após tratamento de biodegradação pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)				Associação ao meio de cultura		
			50		200		F	F + A50	F + A200
			Meio de cultura	Meio de cultura	F	F + A50			
20 horas	22,12(0,010)	15,49(0,010) <sup>a</sup>	20,75(0,010)	20,80(0,010)	18,78(0,010) <sup>a</sup>	17,24(0,010) <sup>a</sup>	18,49(0,010) <sup>a</sup>	16,16(0,011) <sup>ab</sup>	
48 horas - rec.	25,32(0,010)	20,90(0,010) <sup>ac</sup>	13,13(0,010) <sup>ac</sup>	13,97(0,011) <sup>ac</sup>	17,62(0,010) <sup>a</sup>	18,29(0,010) <sup>a</sup>	19,60(0,009) <sup>a</sup>	19,23(0,010) <sup>a</sup>	
72 horas - rec.	22,63(0,010)	20,55(0,010)	13,32(0,010) <sup>ac</sup>	16,33(0,011) <sup>ac</sup>	17,94(0,010) <sup>a</sup>	19,06(0,009) <sup>a</sup>	19,27(0,010) <sup>a</sup>	18,21(0,010) <sup>a</sup>	

**Nota.** CN, Controle Negativo; **CP.** Controle Positivo; **F.** Fungos associados ao meio de cultura; **F+A50.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; **F+A200.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 2.** Frequência (%) das alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de metabólitos, para o tratamento de 20 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)			Meio de cultura			Associação ao meio de cultura					
			200			F			F + A50			F + A200		
			50	200	200	F	F	F + A50	F	F + A50	F + A200			
<b>ACN</b>														
Perdas de material genético	0,17(0,016)	1,04(0,012) <sup>a</sup>	1,31(0,021) <sup>a</sup>	1,39(0,020) <sup>a</sup>	0,33(0,015)	0,21(0,015)	0,19(0,020) <sup>b</sup>	0,39(0,014)						
Perdas cromossômicas	0,02(0,010)	0,13(0,013)	0,13(0,013)	0,39(0,019) <sup>a</sup>	0,10(0,021)	0,12(0,014)	0,23(0,018) <sup>a</sup>	0,38(0,017) <sup>a</sup>						
Aderências cromossômicas	0,02(0,010)	0,18(0,010)	0,29(0,018) <sup>a</sup>	0,34(0,018) <sup>a</sup>	0,17(0,016)	0,21(0,030)	0,31(0,017) <sup>a</sup>	0,43(0,024) <sup>a</sup>						
Brotos nucleares	0	0,09(0,011)	0,06(0,014)	0,07(0,021)	0,41(0,017) <sup>a</sup>	1,06(0,040) <sup>a</sup>	2,91(0,048) <sup>ab</sup>	2,52(0,036) <sup>ab</sup>						
C-metáfases	0,05(0,010)	0,05(0,010)	0,05(0,010)	0,30(0,015) <sup>a</sup>	0,11(0,014)	0,06(0,014)	0,27(0,014)	0,32(0,022) <sup>a</sup>						
Poliploidias (metáfase)	0,01(0,011)	0,12(0,013)	0,12(0,014)	0,16(0,021) <sup>a</sup>	0	0	0	0,10(0,017)						
Poliploidias (intérfase)	0,01(0,011)	0,05(0,015)	0,12(0,020)	0	0,02(0,022)	0,02(0,012)	0,17(0,022) <sup>a</sup>	1,16(0,035) <sup>ab</sup>						
Pontes cromossômicas	0,03(0,010)	0,17(0,014) <sup>a</sup>	0,11(0,013)	0,13(0,016)	0,06(0,009)	0,06(0,014)	0,10(0,017)	0,18(0,020) <sup>a</sup>						
Multipolaridades	0,02(0,010)	0,08(0,013)	0,11(0,013)	0,14(0,016)	0,04(0,009)	0,10(0,014)	0,37(0,025) <sup>a</sup>	0,30(0,018) <sup>a</sup>						
Binucleadas	0	0,19(0,012) <sup>a</sup>	0,08(0,016)	0,06(0,009)	0	0,04(0,014)	0,56(0,025) <sup>ab</sup>	0,41(0,025) <sup>ab</sup>						
Total de ACN	0,33(0,015)	2,10(0,015) <sup>a</sup>	2,38(0,021) <sup>a</sup>	2,98(0,016) <sup>a</sup>	1,24(0,014)	1,88(0,013)	5,11(0,012) <sup>a</sup>	6,19(0,012) <sup>a</sup>						
<b>MN/Q</b>														
Micronúcleos	0,21(0,018)	2,22(0,011) <sup>a</sup>	1,17(0,013) <sup>a</sup>	1,06(0,027) <sup>a</sup>	0,48(0,021)	0,19(0,017)	0,58(0,021)	0,59(0,014)						
Quebras Cromossômicas	0,05(0,019)	0,44(0,028) <sup>a</sup>	0,22(0,019)	0,28(0,020)	0,14(0,020)	0,04(0,018)	0,02(0,014)	0,20(0,019)						
Total de MN/Q	0,26(0,010)	2,66(0,022) <sup>a</sup>	1,39(0,036) <sup>a</sup>	1,34(0,018) <sup>a</sup>	0,62(0,019)	0,23(0,019)	0,60(0,023)	0,79(0,022)						
<b>AP/NE</b>														
Células em apoptose	0	0,03(0,014)	0	0,11(0,000)	0	0	0	0,28(0,039) <sup>a</sup>						
Células em necrose	0	0,78(0,033) <sup>a</sup>	0,99(0,051) <sup>a</sup>	1,19(0,038) <sup>a</sup>	0,11(0,021)	0,08(0,024)	1,33(0,049) <sup>a</sup>	3,02(0,048) <sup>a</sup>						
Total de AP/NE	0	0,81(0,044) <sup>a</sup>	0,99(0,051) <sup>a</sup>	1,30(0,055) <sup>a</sup>	0,11(0,021)	0,08(0,024)	1,33(0,049) <sup>a</sup>	3,31(0,054) <sup>a</sup>						
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	<b>0,59(0,043)</b>	<b>5,57(0,026)<sup>a</sup></b>	<b>4,76(0,057)</b>	<b>5,62(0,062)<sup>a</sup></b>	<b>1,97(0,034)</b>	<b>2,19(0,032)</b>	<b>7,04(0,055)<sup>a</sup></b>	<b>10,29(0,061)<sup>a</sup></b>						

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; F. Fungos associados ao meio de cultura; F+A50. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; F+A200. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 3.** Frequência (%) das alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de seus metabólitos, para o tratamento de recuperação de 48 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura			Associação ao meio de cultura		
					cultura					
			50	200	F	F + A50	F + A200			
<b>ACN</b>										
Perdas de material genético	0,24(0,018)	1,80(0,014) <sup>a</sup>	0,81(0,034)	0,92(0,031)	0,11(0,020)	0,10(0,014)	0,21(0,017)	0,69(0,014)		
Perdas cromossômicas	0,08(0,010)	0,25(0,014)	0,07(0,010)	0,16(0,013)	0,06(0,009)	0,15(0,020)	0,28(0,017)	0,35(0,012) <sup>a</sup>		
Aderências cromossômicas	0,07(0,010)	0,13(0,013)	0,28(0,019)	0,14(0,014)	0,08(0,014)	0,02(0,009)	0,04(0,009) <sup>bc</sup>	0,23(0,020)		
Brotos nucleares	0,01(0,014)	0,08(0,016)	0,06(0,019)	0,06(0,020)	0,60(0,014) <sup>a</sup>	0,80(0,019) <sup>a</sup>	1,02(0,031) <sup>abc</sup>	1,16(0,023) <sup>abc</sup>		
C-metáfases	0,02(0,010)	0,25(0,015) <sup>ac</sup>	0,08(0,010)	0,10(0,012) <sup>c</sup>	0,15(0,018)	0,37(0,020) <sup>ac</sup>	0,26(0,014) <sup>a</sup>	0,21(0,017) <sup>a</sup>		
Poliploidias (metáfase)	0,01(0,011)	0 <sup>c</sup>	0,06(0,014)	0,10(0,022)	0	0	0	0,04(0,032)		
Poliploidias (intérfase)	0	0,10(0,017)	0,07(0,018)	0,15(0,019) <sup>ac</sup>	0,04(0,020)	0,04(0,024)	0,13(0,024)	0,23(0,036) <sup>ac</sup>		
Pontes cromossômicas	0	0,31(0,021) <sup>a</sup>	0,15(0,017) <sup>a</sup>	0,10(0,022)	0,02(0,015)	0,04(0,011)	0,09(0,025)	0,06(0,018)		
Multipolaridades	0,02(0,010)	0,17(0,012) <sup>a</sup>	0,06(0,010)	0,10(0,014)	0	0,09(0,021)	0,19(0,025) <sup>a</sup>	0,08(0,015)		
Binucleadas	0	0,10(0,014)	0,06(0,009)	0,07(0,009)	0,08(0,009)	0,06(0,014)	0,15(0,025) <sup>ac</sup>	0,14(0,022) <sup>ac</sup>		
Total de ACN	0,45(0,018)	3,19(0,013) <sup>ac</sup>	1,70(0,022)	1,90(0,016) <sup>a</sup>	1,14(0,020)	1,67(0,015)	2,37(0,014) <sup>ac</sup>	3,19(0,013) <sup>ac</sup>		
<b>MN/Q</b>										
Micronúcleos	0,21(0,017)	2,45(0,018) <sup>a</sup>	0,89(0,019)	1,11(0,017) <sup>a</sup>	0,23(0,021)	0,17(0,016)	0,11(0,009) <sup>bc</sup>	0,49(0,018) <sup>b</sup>		
Quebras Cromossômicas	0,01(0,013)	0,30(0,015) <sup>a</sup>	0,13(0,012)	0,15(0,021)	0 <sup>c</sup>	0,12(0,017)	0,07(0,021)	0,14(0,013)		
Total de MN/Q	0,22(0,012)	2,75(0,049) <sup>a</sup>	1,02(0,025)	1,26(0,068) <sup>a</sup>	0,23(0,063)	0,29(0,025)	0,18(0,039) <sup>bc</sup>	0,63(0,023) <sup>b</sup>		
<b>AP/NE</b>										
Células em apoptose	0	0	0	0 <sup>c</sup>	0	0	0	0 <sup>c</sup>		
Células em necrose	0	0,06(0,027) <sup>c</sup>	0,05(0,022) <sup>c</sup>	0,46(0,039) <sup>ac</sup>	0,29(0,025) <sup>c</sup>	0,48(0,024) <sup>ac</sup>	0,39(0,025) <sup>a</sup>	0,37(0,039) <sup>ac</sup>		
Total de AP/NE	0	0,06(0,027) <sup>c</sup>	0,05(0,022) <sup>c</sup>	0,46(0,039) <sup>ac</sup>	0,29(0,025) <sup>c</sup>	0,48(0,024) <sup>ac</sup>	0,39(0,025) <sup>a</sup>	0,37(0,039) <sup>ac</sup>		
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>										
	0,67(0,045)	6,00(0,042) <sup>a</sup>	2,77(0,037)	3,62(0,056)	1,66(0,023)	2,44(0,036)	2,94(0,025)	4,20(0,033) <sup>c</sup>		

**Nota.** CN. Controle Negativo; **CP.** Controle Positivo; **F.** Fungos associados ao meio de cultura; **F+A50.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; **F+A200.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 4.** Frequência (%) das alterações (ACN, MN/Q e AP/NE) observadas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de seus metabólitos, para o tratamento de recuperação de 72 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura			Associação ao meio de cultura						
			50	200	cultura			F	F + A50	F + A200				
					0	0	0							
<b>ACN</b>														
Perdas de material genético	0,19(0,013)	1,19(0,012) <sup>a</sup>	0,37(0,021) <sup>c</sup>	0,69(0,027)	0,02(0,010)	0,32(0,016)	0,17(0,015)	0,37(0,023)						
Perdas cromossômicas	0,04(0,014)	0,39(0,012) <sup>a</sup>	0,14(0,014)	0,13(0,016) <sup>c</sup>	0,02(0,010)	0,09(0,017)	0,21(0,018)	0,62(0,016) <sup>ab</sup>						
Aderências cromossômicas	0,07(0,010)	0,09(0,012)	0,27(0,020) <sup>a</sup>	0,22(0,015)	0,08(0,018)	0,04(0,009)	0,06(0,014) <sup>bc</sup>	0,20(0,020)						
Brotos nucleares	0	0,08(0,015)	0,07(0,013)	0,07(0,021)	0,35(0,022) <sup>a</sup>	0,27(0,033) <sup>ac</sup>	0,62(0,034) <sup>abc</sup>	0,84(0,028) <sup>abc</sup>						
C-metáfases	0,03(0,010)	0,15(0,018)	0,09(0,010)	0,13(0,015)	0,04(0,010)	0,11(0,019)	0,56(0,023) <sup>ab</sup>	0,74(0,014) <sup>abc</sup>						
Poliploidias (metáfase)*	0	0,03(0,012)	0,09(0,014)	0,09(0,025)	0	0	0,04(0,017)	0,21(0,022) <sup>a</sup>						
Poliploidias (intérfase)	0	0,08(0,020)	0,12(0,014)	0,16(0,022) <sup>ac</sup>	0,12(0,020)	0,06(0,020)	0,11(0,021)	0,06(0,015) <sup>c</sup>						
Pontes cromossômicas	0,01(0,013)	0,11(0,021)	0,08(0,015)	0,13(0,021) <sup>a</sup>	0,04(0,014)	0,04(0,021)	0,19(0,019) <sup>a</sup>	0,10(0,014)						
Multipolaridades	0,04(0,012)	0,02(0,015)	0,08(0,016)	0,14(0,022)	0	0,02(0,024)	0,08(0,016) <sup>c</sup>	0,21(0,022)						
Binucleadas	0	0,04(0,014) <sup>c</sup>	0,06(0,019)	0,09(0,015)	0	0	0,08(0,015) <sup>c</sup>	0,12(0,019) <sup>c</sup>						
Total de ACN	0,38(0,014)	2,18(0,011) <sup>a</sup>	1,37(0,018)	1,85(0,017) <sup>a</sup>	0,67(0,016) <sup>c</sup>	0,95(0,013) <sup>c</sup>	2,12(0,015) <sup>ac</sup>	3,47(0,014) <sup>ac</sup>						
<b>MN/Q</b>														
Micronúcleos	0,25(0,018)	2,06(0,016) <sup>a</sup>	0,50(0,011) <sup>c</sup>	1,04(0,017) <sup>a</sup>	0,04(0,010) <sup>c</sup>	0,25(0,016)	0,23(0,015)	1,05(0,020) <sup>a</sup>						
Quebras Cromossômicas	0,01(0,020)	0,13(0,017) <sup>c</sup>	0,08(0,015)	0,13(0,004)	0,02(0,024)	0	0,04(0,026)	0,39(0,031) <sup>a</sup>						
Total de MN/Q	0,26(0,014)	2,19(0,047) <sup>a</sup>	0,58(0,045) <sup>c</sup>	1,17(0,039) <sup>a</sup>	0,06(0,009) <sup>c</sup>	0,25(0,017)	0,27(0,020)	1,44(0,038) <sup>ac</sup>						
<b>AP/NE</b>														
Células em apoptose	0	0,02(0,024)	0,05(0,019)	0,02(0,025)	0	0	0,07(0,022)	2,77(0,051) <sup>abc</sup>						
Células em necrose	0,05(0,034)	0,30(0,019)	0,24(0,026)	0,46(0,033) <sup>a</sup>	0,15(0,024)	0,21(0,018)	0,29(0,027) <sup>c</sup>	0,43(0,029) <sup>ac</sup>						
Total de AP/NE	0,05(0,034)	0,32(0,046)	0,29(0,055)	0,48(0,061) <sup>a</sup>	0,15(0,024)	0,21(0,018)	0,36(0,045) <sup>c</sup>	3,20(0,033) <sup>a</sup>						
<b>ACN+MN/Q+AP/NE</b>	0,69(0,024)	4,69(0,039)	2,24(0,044) <sup>c</sup>	3,50(0,051) <sup>c</sup>	0,88(0,019) <sup>c</sup>	1,41(0,023)	2,75(0,045) <sup>c</sup>	8,11(0,055) <sup>a</sup>						

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; F. Fungos associados ao meio de cultura; F+A50. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; F+A200. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

\* Todas essas células poliploides observadas no estágio de metáfase também se tratavam de células C-metáfásicas.

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 5.** Frequências de MN observada em células F<sub>1</sub> de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de seus metabólitos, antes e após tratamento de biodegradação pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura		Associação ao meio de cultura	
			50	200	F	F + A200	F	F + A50
20 horas	0,39(0,069)	9,31(0,072) <sup>a</sup>	5,02(0,061) <sup>a</sup>	5,68(0,057) <sup>a</sup>	0,96(0,070)	2,02(0,053)	3,29(0,054) <sup>a</sup>	4,79(0,057) <sup>a</sup>
48 horas - rec.	0,29(0,073)	8,07(0,066) <sup>a</sup>	2,06(0,054) <sup>c</sup>	9,38(0,057) <sup>ac</sup>	0,79(0,071)	0,99(0,071) <sup>c</sup>	2,91(0,058) <sup>a</sup>	3,63(0,054) <sup>a</sup>
72 horas - rec.	0,29(0,073)	4,82(0,056) <sup>ac</sup>	1,48(0,062) <sup>c</sup>	5,91(0,054) <sup>a</sup>	0,78(0,088)	0,88(0,065) <sup>c</sup>	1,27(0,056) <sup>c</sup>	1,27(0,077) <sup>bc</sup>

**Nota.** CN, Controle Negativo; **CP.** Controle Positivo; **F.** Fungos associados ao meio de cultura; **F+A50.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; **F+A200.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

2000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 6.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observada nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de seus metabólitos, antes e após tratamento de biodegradação fúngica, para o tratamento de 20 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)		Meio de cultura	Associação ao meio de cultura	
			50	200		F	F + A50
<b>Nº de nucléolos por célula</b>							
1 nucléolo	10,57(0,011)	12,41(0,011)	13,20(0,011)	13,43(0,012)	14,22(0,010) <sup>a</sup>	14,42(0,010) <sup>a</sup>	9,56(0,012) <sup>b</sup>
2 nucléolos	43,62(0,011)	45,37(0,010)	40,93(0,010)	43,09(0,010)	40,10(0,010)	39,60(0,009)	32,40(0,010) <sup>ab</sup>
3 nucléolos	43,32(0,010)	36,42(0,010) <sup>a</sup>	37,86(0,010) <sup>a</sup>	36,07(0,011) <sup>a</sup>	39,94(0,010)	38,73(0,010) <sup>a</sup>	33,70(0,010) <sup>a</sup>
4 nucléolos	1,92(0,014)	4,58(0,031)	6,82(0,024)	5,91(0,012)	4,58(0,010)	6,44(0,013)	19,82(0,015) <sup>ab</sup>
5 nucléolos	0,57(0,014)	0,78(0,012)	1,07(0,024)	1,00(0,016)	0,81(0,014)	0,63(0,013)	3,35(0,011) <sup>ab</sup>
6 nucléolos	0	0,28(0,010) <sup>a</sup>	0,10(0,012)	0,46(0,009) <sup>a</sup>	0,34(0,010) <sup>a</sup>	0,18(0,012)	0,99(0,023) <sup>a</sup>
7 nucléolos	0	0,13(0,012) <sup>a</sup>	0,02(0,010)	0,03(0,011)	0	0	0,18(0,024) <sup>a</sup>
8 nucléolos	0	0,03(0,020)	0	0,01(0,011)	0	0	0

**Nota.** CN, Controle Negativo; **CP.** Controle Positivo; **F.** Fungos associados ao meio de cultura; **F+A50.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; **F+A200.** Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 7.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observada nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de seus metabólitos, antes e após tratamento de biodegradação fúngica, para o tratamento de 48 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)			Associação ao meio de cultura		
			Meio de cultura			Associação ao meio de cultura		
			50	200	2000	F	F + A50	F + A200
<b>Nº de nucléolos por célula</b>								
1 nucléolo	10,74(0,012)	14,27(0,012)	10,69(0,012) <sup>c</sup>	12,63(0,012)	10,08(0,011) <sup>c</sup>	13,08(0,011)	10,81(0,010)	14,89(0,015) <sup>c</sup>
2 nucléolos	39,58(0,010) <sup>c</sup>	46,47(0,011) <sup>a</sup>	36,14(0,011)	34,91(0,011)	33,49(0,011) <sup>c</sup>	38,00(0,010)	34,65(0,010)	41,61(0,011) <sup>c</sup>
3 nucléolos	37,28(0,010) <sup>c</sup>	25,99(0,012) <sup>ac</sup>	39,42(0,010)	37,96(0,009) <sup>c</sup>	45,04(0,010) <sup>ac</sup>	40,35(0,010)	38,93(0,010)	35,70(0,011)
4 nucléolos	11,56(0,014) <sup>c</sup>	9,91(0,012) <sup>c</sup>	9,78(0,018)	10,69(0,017)	10,04(0,015) <sup>c</sup>	7,26(0,011)	13,48(0,010)	6,86(0,017) <sup>c</sup>
5 nucléolos	0,78(0,012)	2,86(0,025) <sup>ac</sup>	2,87(0,015) <sup>ac</sup>	2,41(0,018) <sup>ac</sup>	1,13(0,017)	1,11(0,018)	1,83(0,020) <sup>a</sup>	0,65(0,022) <sup>bc</sup>
6 nucléolos	0,06(0,010)	0,49(0,014) <sup>ac</sup>	1,05(0,010) <sup>ac</sup>	1,37(0,012) <sup>ac</sup>	0,22(0,014)	0,20(0,021)	0,30(0,022)	0,28(0,019) <sup>c</sup>
7 nucléolos	0	0 <sup>c</sup>	0,05(0,011)	0,03(0,010)	0	0	0	0 <sup>c</sup>
8 nucléolos	0	0	0	0	0	0	0	0

**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; F. Fungos associados ao meio de cultura; F+A50. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; F+A200. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 8.** Frequências (%) da quantidade de nucléolos observada nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do corante BDCP e de seus metabólitos, antes e após tratamento de biodegradação fúngica, para o tratamento de 72 horas.

Tratamentos	CN	CP	Concentrações do azocorante (µg/L)			Associação ao meio de cultura		
			Meio de cultura			Associação ao meio de cultura		
			50	200	2000	F	F + A50	F + A200
<b>Nº de nucléolos por célula</b>								
1 nucléolo	11,34(0,012)	16,35(0,010) <sup>ac</sup>	12,97(0,010)	12,75(0,011)	12,11(0,010)	17,07(0,012) <sup>a</sup>	11,83(0,011)	15,03(0,011) <sup>c</sup>
2 nucléolos	42,58(0,010)	43,03(0,011)	34,55(0,012) <sup>a</sup>	36,21(0,012) <sup>ac</sup>	38,36(0,011)	45,64(0,010) <sup>c</sup>	40,94(0,012) <sup>c</sup>	38,54(0,010) <sup>c</sup>
3 nucléolos	40,69(0,010)	34,07(0,011) <sup>a</sup>	38,95(0,010)	37,40(0,010)	40,13(0,010)	32,09(0,012) <sup>a</sup>	35,60(0,011) <sup>c</sup>	36,22(0,010) <sup>c</sup>
4 nucléolos	4,93(0,013) <sup>c</sup>	6,13(0,012)	11,43(0,021) <sup>a</sup>	11,84(0,019) <sup>a</sup>	8,28(0,013) <sup>c</sup>	4,79(0,011) <sup>c</sup>	10,20(0,016) <sup>a</sup>	8,76(0,012) <sup>ac</sup>
5 nucléolos	0,30(0,014) <sup>c</sup>	0,26(0,022) <sup>c</sup>	1,92(0,011) <sup>ac</sup>	1,48(0,013) <sup>ac</sup>	0,99(0,016)	0,38(0,011) <sup>c</sup>	1,09(0,015) <sup>a</sup>	0,77(0,014) <sup>c</sup>
6 nucléolos	0,16(0,010) <sup>c</sup>	0,16(0,012)	0,15(0,015)	0,27(0,020)	0,14(0,009) <sup>c</sup>	0,04(0,014)	0,34(0,012)	0,68(0,022) <sup>a</sup>
7 nucléolos	0	0,02(0,010) <sup>c</sup>	0,05(0,009)	0	0	0	0	0 <sup>c</sup>
8 nucléolos	0	0	0,01(0,011)	0	0	0	0	0

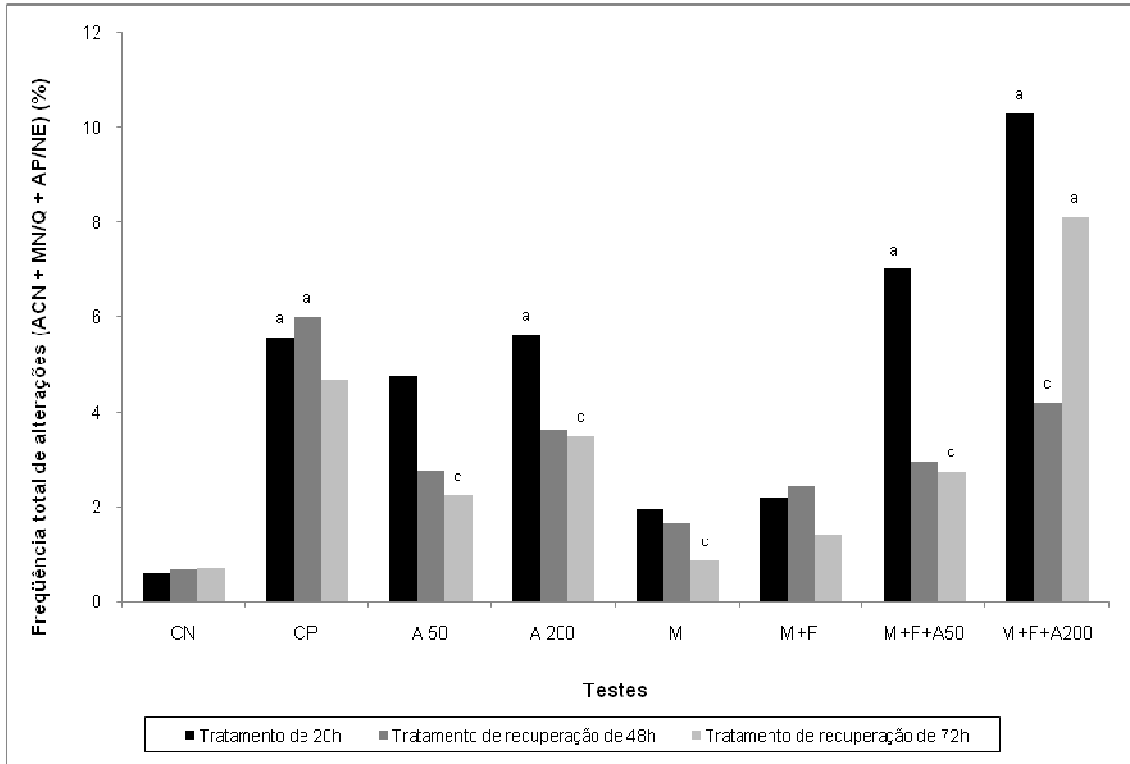
**Nota.** CN. Controle Negativo; CP. Controle Positivo; F. Fungos associados ao meio de cultura; F+A50. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 50 µg/L do azocorante; F+A200. Fungos associados ao meio de cultura e à concentração de 200 µg/L do azocorante.

10000 células analisadas por concentração e tratamento. Média (Desvio-padrão).

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> Significativamente diferente do teste sem biodegradação ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.



**Figura 1.** Frequência total de células portadoras de alterações (ACN+MN/Q+AP/NE), para os tratamentos de 20 h e de recuperação por 48 e 72 h.

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.

<sup>c</sup> Significativamente diferente do tratamento de 20 horas ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste Kruskal-Wallis.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABTI, K. Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 149-155, 2000.
- ALVES DE LIMA, R.O.; BAZO, A.P.; SAVADORI, D.M.F.; RECH, C.M.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research**, v. 626, p. 53-60, 2007.
- ARKHIPCHUK, V.V.; GARANKO, N.N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 187-194, 2002.
- ARLT, V.M.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PAPEL, U.; SORG, B.L.; SCHMEISER, H.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of environmental contaminant 3- nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferases. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1937-1945, 2002.
- AZMI, W.; SANI, R.J.; BANERJEE, U.C. Biodegradation of triphenylmethane dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 185-191, 1998.
- BARTSCH, H. Metabolic activation of aromatic amines and azo dyes. **International Agency of Research on Cancer**, v. 40, p.13-30, 1981.
- BELL, J.; PLUMB, J.J.; BUCKLEY, C.A.; STUCKEY, D.C. Treatment and decolourization of dyes in anaerobic baffled reactor. **Journal of Environmental Engineering**, v. 126, p. 1026-1032, 2000.
- CAMPOS, A. **Blendas de PVC/PCL foto/termo e biotratadas com fungos de solo (*Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus funigatus*)**. 2004. 114f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p.722-725, 2008.
- CARLIELL, C.M.; BARCLAY, S.J.; NAIDOO, N.; BUCKLEY, C.A.; MULHOLLAND, D.A.; SENIOR, E. Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water SA**, v. 21, p. 61-69, 1995.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, p. 159-168, 2002.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research**, v. 534, p. 93-99, 2003.

CHUNG, K.T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. **Mutation Research**, v. 114, p. 269-281, 1983.

CHUNG, K.T.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes: structure activity relationship. **Mutation Research**, v. 277, p. 201-220, 1992.

CHUNG, K.T.; STEVENS, J.R. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

CLARKE, E.A.; ANLIKER, R. Organic dyes and pigments. In: Hutzinger, O., Editor. The handbook of environmental chemistry, v. 3, part. A. **Anthropogenic Compounds**. Estados Unidos: Springer-Verlag, 1980. 215 p.

CONSTANTIN, M.J.; OWENS, E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays – a report of the US EPA's GENETOX Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 1-12, 1982.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F., FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* - micronucleus and the *Tradescantia* - micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 167-171, 1999.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J.; AUST, S. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1114-1118, 1990.

DE SERRES, F.J. Preface: Higher plants as effective monitors of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 270, p. 1-3, 1992.

DUKE, R.C.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J.D. Apoptosis. **Scientific American**, v. 3, p. 36-51, 1996.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent – Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. Technical Methods Section. *Allium* test I: A 2-3 Day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, New York, v. 8, p. 461-470, 1993.

FONSECA, A.A.F. **Estudo *in vitro* da toxicidade de corantes têxteis azo em *Tetrahymena pyriformis***. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal, 2006.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul.** 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 1999.

GOSZCZYNSKI, S.; PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M.B.; CRAWFORD, R.L. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1339-1347, 1994.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, v. 281, p. 89-92, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations. **Mutation Research**, v. 426, p. 107-112, 1999.

HIZUME, M.; SATO, S.; TANAKA, A. A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. **Stain Technology**, v. 55, v. 87-90, 1980.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

GIACOMELLI, F.R.B. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul.** 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 1999.

JESUS, G.J. **Aplicação de *Neurospora crassa* para a avaliação da biosorção e biodegradação de corantes ácido, xanteno, direto e reativo.** 2005. 172f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

KAMMRADT, P.B. **Remoção de cor de efluentes de tinturarias industriais através de processo de oxidação avançada.** 2004, 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 25, p. 78, 2002.

LEACH, N.T.; JACKSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? **Mutation Research**, v. 554, p. 89-94, 2004.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

LEVINE, W.G. Metabolism of azo dyes: implications for detoxication and activation. **Drug Metab. Rev.**, v. 23, p. 253-309, 1991.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MARCANO, L; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of malei hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221-226, 2004.

MARTINS, M.A.; FERREIRA, I.C; SANTOS, I.M.; QUEIROZ M.J.; LIMA N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 91-98, 2001.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MATSUMOTO, S.T. ; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I. ; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C. ; MARIN-MORALES, M.A. . Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MATSUOKA, A.; TADA, A.; TERAOKA, Y; NUKAYA, H.; ÖNFELT, A.; WAKABAYASHI, K. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (azo dyes) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. **Mutation Research**, v. 493, p. 75-85, 2001.

MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.

MIGID, H.M.A.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 57-64, 2007.

MURRAY, B.G.; BENNETT, M.D.; HAMMETT, K.R.W. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in situ* hybridization. **Heredity**, v. 68, p. 473-478, 1992.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v. 626, p. 135-142, 2007.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1978. 276f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Complutense, Madrid, 1978.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON, M.A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 444, p. 175-180, 1999.

RAMALHO, P.A.; PAIVA, S.; CAVACO-PAULO, A.; CASAL, M.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T. Azo reductase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of the plasma membrane ferric reductase. **Applied and Environmental Technology**, v. 71, p. 3882-3888, 2005.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1998.

RAO, B.V. Cytological effects of pendimethalin in *Allium cepa* root meristems. **Cell Chromosome Research**, v. 12, p. 57-59, 1989.

REID, T.M.; MORTON, K.C.; WANG, C.Y.; KING, C.M. Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative systems. **Environmental Mutagenicity**, v. 6, p. 705-717, 1984.

ROSENKRANZ, H.S.; KLOPMAN, G. Structural basis of the mutagenicity of phenylazo-aniline dyes. **Mutation Research**, v. 221, p. 217-234, 1989.

ROSENKRANZ, H.S.; KLOPMAN, G. Structural basis of the mutagenicity of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes. **Mutagenesis**, v. 5, p. 137-146, 1990.

SHARMA, V.K. **Isolation and characterisation of cellulolytic bacteria from a cattle-waste digester.** 1983, 127f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Aberdeen University, UK, 1983.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOUKAM, T.M.A.M. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research: Genetic Toxicology**, v. 38, p. 171-179, 1997.

SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397-2401, 1992.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBERIO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007.

TSUDA, S; MATSUSAKA, N; MADARAME, H.; UENO, S; SUSA, N.; ISHIDA, K; KAWAMURA, N.; SEKIHASHI, K.; SASAKI, Y.F. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mutation Research**, v. 465, p. 11-26, 2000.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4-14, 2007.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

VIEIRA, S. **Bioestatística – Tópicos Avançados, Testes não paramétricos, tabelas de contringência e análise de regressão**. 1 ed., Rio de Janeiro: Editora Campus, 2004, p. 23-27.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Adv**, v. 22, p. 161-187, 2003.

ZHAO, X.; HARDIN, I.R.; HWANG, H-M. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 57, p. 1-6, 2006.

ZOLLINGER, H. **Color–Chemistry–Synthesis: Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments**. 1 ed., New York: VCH Publishers, 1987. 310 p.

## **10. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- Todas as concentrações testadas do corante comercial BDCP (1, 10 100 e 1000 µg/L) apresentaram efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos para o organismo-teste de *A. cepa*.

- Foi verificado que o azocorante estudado possui ação aneugênica, pela presença de aberrações cromossômicas decorrentes de alterações nas estruturas citoplasmáticas, como, por exemplo, nos microtúbulos. O corante também exibiu uma ação clastogênica, comprovada pela presença de aberrações cromossômicas do tipo quebras cromossômicas.

- As técnicas de bandamentos cromossômicos e de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) trouxeram informações adicionais sobre o modo de ação do corante sobre as células do organismo-teste *Allium cepa*. Pela aplicação da técnica de bandamento AgNOR, foram observadas variações no número de nucléolos, o que pode estar relacionado com a potencial indução de poliploidização do corante, confirmando, assim, a ação aneugênica do mesmo. As demais técnicas aplicadas, como bandamentos C, fluorocromos base-específicos e a técnica de FISH, mostraram-se eficientes na detecção de sítios cromossômicos mais susceptíveis às quebras, o que pôde confirmar a ação aneugênica do azocorante. Estas técnicas se mostraram eficientes na análise de alterações cromossômicas, esclarecendo, muitas vezes, os resultados obtidos com a técnica citogenética de coloração convencional. Por esta razão, podemos inferir que a aplicação das técnicas de bandamentos cromossômicos e de FISH, adicionalmente à técnica de citogenética convencional, pode se caracterizar em importante ferramenta na avaliação de comprometimentos ambientais por poluentes diversos. A aplicação conjunta

dessas técnicas proporciona resultados mais precisos e detalhados do potencial genotóxico e mutagênico de poluentes, completando assim os tradicionais ensaios de aberrações cromossômicas.

- Por este estudo foi constatado que, quando o corante BDCP passa por tratamento de biodegradação por microrganismos (*pool* de bactérias heterotróficas, leveduras da espécie *C. viswanathii*; e o fungo *P. chrysosporium*), sua potencialidade tóxica aumenta, o que comprova que a biodegradação deste azocorante produz metabólitos potencialmente mais tóxicos que o próprio azocorante, provavelmente decorrentes da clivagem das ligações azo.

- Quanto à genotoxicidade, os metabólitos do azocorante BDCP, independentemente do microrganismo utilizado para a biodegradação, parecem ser semelhantes (mesmo grupo químico), pois induziram os mesmos efeitos genotóxicos sobre o organismo teste.

- Quanto aos efeitos citotóxicos, os metabólitos produzidos pela biodegradação dos diferentes microrganismos apresentaram efeitos diferentes entre si. Assim, cada microrganismo deve produzir metabólitos intermediários diferentes, adicionalmente àqueles de ação genotóxica, o que confere a ação citotóxica específica para cada um deles. Foi observado que a levedura *C. viswanathii* e o fungo basidiomiceto induziram frequências significativas de células apoptóticas, enquanto que as bactérias induziram apenas frequências significativas de células necróticas. Dessa maneira, podemos inferir que as vias de degradação do azocorante pelas leveduras e fungos parecem ser similares entre si, porém diferentes das promovidas pelas bactérias heterotróficas.

- Apesar dos tratamentos de recuperação terem reduzido as frequências de danos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em quase todos os ensaios realizados com o azocorante, os efeitos provocados por ele não foram totalmente eliminados, após a normalização das condições de exposição do organismo teste.

- Contaminações por corantes do tipo azo podem caracterizar um grande perigo para os organismos expostos, pois além de serem tóxicos pelas suas próprias propriedades químicas, podem se transformar em compostos ainda mais tóxicos pela sua metabolização por microrganismos presentes no ambiente.

- Por todo o exposto, podemos afirmar que existe uma necessidade eminente de se avaliar a efetividade de tratamentos biológicos de efluentes industriais, pois, muitas vezes, os produtos da biodegradação são ainda mais detrimenais para o ambiente, pela alta toxicidade



## *Considerações Finais*

---

dos metabólitos produzidos durante os próprios processos de biodegradação, como foi observado nos resultados desse estudo.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-RAHIM, W.M.; MOAWAD, H. Enhancing bioremoval of textile dyes by eight fungal strains from media supplemented with gelatine wastes and sucrose. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 367-375, 2003.

ACHWAL, W.B. Problems during analysis of textile as per ecostandards and the customer articles ordinance (Part I). **Colourage**, v. 44, p. 29-31, 1997.

ACUNER, E; DILEK, F.B. Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 623-631, 2004.

AKSU, Z.; DONMEZ, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. **Chemosphere**, v. 50, p. 1075-1083, 2003.

AL-SABTI, K. Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 149-155, 2000.

ALVES DE LIMA, R.O.; BAZO, A.P.; SAVADORI, D.M.F.; RECH, C.M.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research**, v. 626, p. 53-60, 2007.

AMBRÓSIO, S.T.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresources Technology**, v. 91, p. 69-75, 2004.

AMEMYA, C.T.; GOLD, J.R. Chromomycin A<sub>3</sub> stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. **Copeia**, v. 1, p. 226-231, 1986.

AMES, B.N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-364, 1975.

ANDREAS, K.; KLEIN, J.; KUDLICH, M.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J.; MATTES, R. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid. Degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3684-3690, 1997.

ANGELIS, D.F.; COVOLAN, H.; OLIVEIRA, J.; CORSO, C.R.; KIYAN, C. Remoção de compostos azo por *Saccharomyces boulardii* IZ-1904. **Ciência e cultura**, v. 34, p. 585, 1982.

ANLIKER, A. Ecotoxicology of dyestuffs – a joint effort by industry. **Ecotoxicology and Environmental Microbiology Safety**, v. 3, p. 59-74, 1979.

ANLIKER, R.; STEINLE, D. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v. 104, p. 377-380, 1988.

ARLT, V.M.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PAPEL, U.; SORG, B.L.; SCHMEISER, H.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of environmental contaminant 3- nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferases. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1937-1945, 2002.

AUBERT, S; SCHWITZGUEBEL, J. P. Screening of plant species for the phytotreatment of wastewater containing sulphonated anthraquinones. **Water Research**, v. 38, p. 3569-3575, 2004.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresources Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BARTSCH, H. Metabolic activation of aromatic amines and azo dyes. **International Agency of Research on Cancer**, v. 40, p.13-30, 1981.

BELL, J.; PLUMB, J.J.; BUCKLEY, C.A.; STUCKEY, D.C. Treatment and decolourization of dyes in anaerobic baffled reactor. **Journal of Environmental Engineering**, v. 126, p. 1026-1032, 2000.

BERNINI, C. **Análise citogenética e diferenciação cromossômica em espécies do gênero *Brachiaria* Grisebach**. 1997. 97f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 1997.

BHASKAR, M.; GNANAMANI, A.; GANESHJEEVAN, R.J.; CHANDRASEKAR, R.; SADULLA, S.; RADHAKRISHNAN, G. Analyses of carcinogenic aromatic amines released from harmful azo colorants by *Streptomyces* sp. SS07. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 117-123, 2003.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

- BISWAS, S.J., KHUDA-BUKHSH, A.R. Cytotoxic and genotoxic effects of the azo-dye p-dimethylaminoazobenzene in mice: a time-course study. **Mutation Research**, v. 587, p. 1-8, 2005.
- BORCHERT, M.; LIBRA, J.A. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 75, p. 313-321, 2001.
- BOURGEOIS, C.A. Distribution of mitomycin d-induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA. **Chromosoma: Biology of the Nucleus**, v. 48, p. 203-211, 1974.
- BROWN, D., LABOUREUR, P. The aerobic biodegradability of primary aromatic amines. **Chemosphere**, v. 12, p. 405-414, 1983.
- BROWN, D.; HAMBURGER, B. The degradation of dyestuffs: Part III - Investigations of their ultimate degradability. **Chemosphere**, v. 16, p. 1539-1553, 1987.
- BROWN, S.W. Heterochromatin. **Science**, Washington, v. 151, p. 417-425, 1996.
- BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology**. 2 ed., Estados Unidos: Plenum Publishing Corporation, 1987. p. 1-432.
- BUMPUS, J.A.; BROCK, B.J. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1143-1150, 1988.
- BURKINSHAW, S.M.; GOTSPOULOS, A. The pre-treatment of cotton to enhance its dyeability – sulphur dyes. **Dyes and Pigments**, v. 32, p. 209-228, 1996.
- BUSH, G.L.; CASE, S.M.; WILSON, C.; PARRON, J.L. Rapid speciation and mammalian chromosomes “in vitro”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.** v. 74, p. 3942-3946, 1977.
- CAO, W.B.; MAHADEVAN, D.L.; CRAWFORD, R.L. Characterization of an extracellular azo dye-oxidizing peroxidase from *Flavobacterium* sp. ATCC 39723. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 810-817, 1993.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, p. 159-168, 2002.
- CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R. Nucleolar activity and competition (amphiplasty) in the genus *Aegilops*. **Heredity**, v. 53, p. 603-611, 1984.

- CHA, C.J.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4358-4360, 2001.
- CHAGAS, E.P.; DURRANT, L.R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 473-477, 2001.
- CHAO, W.L.; LEE, S.L. Decoloration of azo dyes by three white-rot fungi: influence of carbon source. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 556-559. 1994.
- CHAUHAN, L.K.S.; SAVENA, P.M.; GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, v. 42, p. 181-189, 1999.
- CHEN, K.C., HUANG, W.T., WU, J.Y.; HOUNG, J-Y. Microbial decolourisation of azo dyes by *Proteus mirabilis*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 686-690, 1999.
- CHIVUKULA, M.; RENGANATHAN, V. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4373-4377, 1995.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; BETIOLI, J.V.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação da influência de agentes contaminantes presentes nos recursos hídricos da região de Araras/SP, por meio do sistema-teste de *Allium cepa*. In: **SBMCTA 2007 – VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**. Mangaratiba, Rio de Janeiro, p. 12. 2007.
- CHUDGAR, R.J. Azo dyes. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 4 ed., New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 821-875.
- CHUNG, K.T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. **Mutation Research**, v. 114, p. 269-281, 1983.
- CHUNG, K.T.; FULK, G.E.; ANDREWS, A.W. Mutagenicity testing of some commonly used dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 641-648, 1981.
- CHUNG, K.T.; STEVENS, J.R. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.
- CLARKE, E.A.; ANLIKER, R. Organic dyes and pigments. In: Hutzinger, O., Editor. The handbook of environmental chemistry, v. 3, part. A. **Anthropogenic Compounds**. Estados Unidos: Springer-Verlag, 1980. 215 p.
- CLONFERO, E.; VERNIER, P.; GRANELL, N.; LEVIS, A.G. Leather azo dyes: mutagenic and carcinogenic risks. **La Medicina del Lavoro**, v. 81, p. 222-229, 1990.

COMBES, R.D.; HAVELAND-SMITH, R.B. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. **Mutation Research**, v. 98, p. 101-248, 1982.

CONNELLY, A.; SMYTH, W.F.; MCMULLAN, G. Metabolism of the phthalocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 333-337, 1999.

CORREIA, V.M.; STEPHENSON, T.; JUDD, S.J. Characterization of textile wastewaters – a review. **Environmental Technology**, v. 15, p. 917-929, 1994.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J.A.; AUST, S.D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1114-1118, 1990.

DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA, DE 15 DE SETEMBRO DE 2003. 1ª série A, nº 213, Ministério da Economia, p. 6014-6016. Portugal.

EDWARDS, J.C. **Investigation of color removal by chemical oxidation for three reactive textile dyes and spent textile dye wastewater**. 2000. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências Ambientais) – Departamento de Engenharia Ambiental e Civil, Universidade do Estado da Virginia, Blackburg, 2000.

EKICI, P.; LEUPOL, G.; PARLAR, H. Degradability of selected azo dye metabolites in activated sludge systems. **Chemosphere**, v. 44, p. 721-728, 2001.

ETAD, 2007. Disponível em: <[http://www.etad.com/information\\_6htm](http://www.etad.com/information_6htm)> Acesso em: 12 de janeiro de 2007.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2005. 212f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERREIRA, I. **Síntese e biodegradação de corantes azo pelo *Phanerochaete chrysosporium***. 1998. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, 1998.

FIELD, J.A.; DE JONG, E.; FEIJOO COSTA, G.; DE BONT, J.A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2219-2226, 1992.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FOUSSEREAU, J.; HERVE-BAZIN, B.; MEYNADIER, J.; REUTER, G.; CAVELIER, C. Allergic contact dermatitis to plastic table cloth and phenyl indole. **Contact Dermatitis**, v. 8, p. 73, 1982.

FREEMAN, H.S.; ESANCY, J.V.; CLAXTON, L.D. An approach to the design of non mutagenic azo dyes: analogs of the mutagen CI Direct Black 17. **Dyes and Pigments**, v. 13, p. 5-77. 1990.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresources Technology**, v. 79, p. 251-262, 2001.

GARG, A.; BHAT, K.L.; BOCK, C.W. Mutagenicity of aminoazobenzene dyes and related structures; a QSAR/QPAR investigation. **Dyes and Pigments**, v. 55, p. 35-52, 2002.

GARNATJE, T.; VALLÈS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). **Plant Biology**, v. 6, p. 140-146, 2004.

GLENN, J.; GOLD, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Technology**, v. 45, p. 1741-1747, 1983.

GOLD, J.J.; HEATH, I.B., BAUCHOP, T. Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov. sp. nov., assigned to the Neocallimasticaceae. **BioSystems**, v. 21, p. 403-415, 1988.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53, p. 37-50, 1975.

GORDON, P.F.; GREGORY, P. **Organic Chemistry in Colour**. 1 ed. New York: Springer-Verlag, 1983, 322p.

GOSZCZYNSKI, S.; PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M.B.; CRAWFORD, R.L. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1339-1347, 1994.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, 1982, p. 273-291, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

GRIFFITHS, J. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed. Oxford. 1984. p. 30.

GUARATINI, C.C.I; ZANONI, M.V.B. Textile Dyes. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.

- GUERRA, M.S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. 1988. p. 31-35.
- GUPTA, P.; SHARMA, T. Non-random distribution of aberrations and identification with C and G-banding of the position of breakage points on Muntjac chromosomes induced by Mitomycin C, Bromodeoxyuridine and Hydroxylamine. **Mutation Research**, v. 81, p. 63-74, 1981.
- HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I.-L.; KNUDSEN, L.E.; LINDHOLM, C.; NORPPA, H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: result from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**, v. 64, p. 2258-2263, 2004.
- HAO, O.J.; KIM, H.; CHIANG, P.C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 449-505, 2000.
- HASHIMOTO, Y; WATANABE, H.; DEGAWA, M. Mutagenicity of methoxyl derivatives of N-hydroxy-4-amino-azobenzenes and 4-nitroazobenzene. **Gann**, v. 68, p. 373-374, 1977.
- HATCH, F.T.; BODNER, A.J.; MAZRINAS, J.A.; MOORE, D.H. Satellite DNA and cytogenetic evolution. DNA quality, satellite DNA and karyotic variations in kangaroo rats. **Chromosome**, v. 58, p. 155-168, 1976.
- HATCH, K.L.; MAIBACH, H.I. Textile dye dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, p. 631-639, 1995.
- HEINFLING, A.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, A.T. Transformation of industrial dyes by manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2788-2793, 1998.
- HEINFLING-WEIDTMANN, A.; REEMTSMA, T.; STORM, T.; SZEWZYK, U. Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, p. 179-183, 2001.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. **Methods of genome analysis in plants**. United States of America: CBR Press, 1996. 179p.
- HILLIKER, A.J.; APPELS, R. The genetic analysis of *D. melanogaster* heterochromatin. **Cell**, v. 21, p. 607-619, 1980.
- HOLME, I. Ecological aspects of color chemistry. **Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes**. 1 ed. Oxford: Society of Chemistry Industry, 1984, 128p.
- HOSHINA, M.M. **Avaliação do possível efeito genotóxico de águas de rios que recebem efluentes de refinaria de petróleo, por meio do sistema teste de *Allium cepa* e de *Oreochromis niloticus***. 2005.160f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.



HSU, T.C. A possible function of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. **Japanese Journal of Genetics**, v. 66, p. 635-661, 1975.

HU, T.L. Degradation of azo dye RP2B by *Pseudomonas luteola*. **Water Science and Technology**, v. 38, p. 299-306, 1998.

IDAKA, E.; OGAWA, T.; HORITSU, H. Reductive metabolism of aminoazobenzenes by *Pseudomonas cepacia*. **Bulletin of Environmental Contaminants and Toxicology**, v. 39, p. 100-107, 1987.

ISIK, M.; SPONZA, D.T. Effect of different oxygen conditions on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp and fate of aromatic amines. **Process Biochemistry**, v. 38, p.1183-1192, 2003.

JADHAV, J.P.; GOVINDWAR, S.P. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Yeast**, v. 23, p. 315-323, 2006.

JADHAV, J.P.; PARSHETTI, G.K.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, p. 394-400, 2007.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KOCHMANSKA-RDEST, J.; MALARCZYK, E.; WARDAS, W.; LEONOWICZ, A. Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 566-572, 2002.

JESUS, G.J. **Aplicação de *Neurospora crassa* para a avaliação da biosorção e biodegradação de corantes ácido, xanteno, direto e reativo**. 2005. 172f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

JEWORSKI, M; HEINZLE, E. Combined chemical-biological treatment of wastewater containing refractory pollutants. **Biotechnology Annual Review**, v. 6, p. 163-196, 2000.

JIANG, J.; GILL, B.S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. **Genome**, Cold Spring Harbor, v. 36, p. 792-795, 1993.

JINKI, L; HOUTIAN, L. Degradation of azo dyes by algae. **Environmental Pollutants**, v. 75, p. 273-278, 1992.

JONES, J.J.; FALKINHAM, I.I.I.J.O. Decolourization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic *Mycobacteria*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p. 2323-2326, 2003.

KAINA, B. The action of N-methyl-N-nitrosourea on non-established human cell lines *in vitro*. II. Non-random distribution of chromatid aberrations in diploid and Down's cell. **Mutation Research**, v. 43, p. 401-413, 1977.

KAKUTA, T.; AOKI, F.; OKADA, T.; HITOSHI, S.; KIYOSHI, Y.; TAKEO, K. Purification and properties of two different azoreductases from a yeast *Candida curvata* AN 723. **Sen'i Gakkaishi**, v. 54, p. 18-25, 1998.

KAMMRADT, P.B. **Remoção de cor de efluentes de tinturarias industriais através de processo de oxidação avançada**. 2004, 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KAPDAN, I.K.; KARGIA, F. Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 195-199, 2002.

KAPDAN, I.K.; KARGIA, F.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 26, p. 381-387, 2000.

KECK, A.; KLEIN, J.; KUDLICH, M.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J.; MATTES, R. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3684-3690, 1997.

KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Bioremediation concepts for treatment of dye containing wastewater: a review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 1068-1075, 2003.

KIHLMAN, B.A. **Actions of chemical on dividing cells**. 1 ed. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1966, 88 p.

KIM, J-S.; CHILDS, K.L.; ISLAM-FARIDI, M.N.; MENZ, M.A.; KLEIN, R.R. Integrated karyotyping of sorghum by *in situ* hybridization of landed BACs. **Genome**, v. 45, p. 402-412, 2002.

KIM, S.J.; ISHIKAWA, K.; HIRAI, M.; SHODA, M. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 601-607, 1995.

KIM, S.J.; SHODA, M. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 62, p. 114-119, 1999.

KIRBY, N.; MARCHANT, R.; MCMULLAN, G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 93-96, 2000.

KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of chemical technology**. 3 ed. New York: Wiley-Inter Science, 1979. 172p.

KROSCWITZ, J.I.; HOWE-G. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 4 ed., New York: John Wiley & Sons, 1993. 358p.

- KUNZ, A. **Remediação de efluente têxtil: combinação entre processo químico (Ozônio) e Biológico (*P. chrysosporium*)**. 1999. 130f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 25, p. 78, 2002.
- KUNZ, A.; REGINATTO, V.; DURAN, N. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. **Chemosphere**, v. 44, p. 281-287, 2001.
- KWASNIEWSKA, K. Biodegradation of crystal violet (hexamethyl-p-rosaniline chloride) by oxidative red yeast. **Bulletin of Environmental Contaminants and Toxicology**, v. 34, p. 323-330, 1985.
- LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 214-219, 2008.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 80-86, 2008.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.
- LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.
- LEVINE, W.G. Metabolism of azo dyes: implications for detoxication and activation. **Drug Metab. Rev.**, v. 23, p. 253-309, 1991.
- LIN, J.K.; WU, Y.H. Studies on the mechanism of methemoglobin formation induced by aminoazo compounds. **Biochemistry Pharmacology**, v. 22, p. 1883-1891, 1973.
- LISE, H.H. Non priority analysis of the wastewater streams of four dye manufacturing facilities. **JWPCF**, v. 62, p. 665-669, 2002.
- LOIDL, M.; HINTEREGGER, C.; DITZELMÜLLER, G.; FERSCHL, A.; STREICHSBIER, F. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains. **Archives of Microbiology**, v. 155, p. 56-61, 1990.
- MA, T.H.; XU, Z.; XU, C; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.
- MAGUIRE, R.J.; TKACZ, R.J. Occurrence of dyes in the Yamaska River, Quebec. **Water Pollution Research**, v. 26, p. 145-161, 1991.

MAJCEN-LE MARECHAL, A.; SLOKAR, Y.M.; TAUFER, T. Decoloration of Chlorotriazine Reactive Azo Dyes with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. **Dyes Pigments**, v. 33, p. 281-298, 1997.

MALUSZYNKA, J.; HESLOP-HARRISON, J.S. Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: *In situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. **Annals of Botany**, v. 71, p. 479-484, 1993.

MARKS, G.E.; SCHWEIZER, D. Giemsa banding karyotype differences in some species of *Anemone* and *Hepatica nobilis*. **Chromosoma**, v. 44, p. 405-421, 1974.

MARTINS, M.A.; CARDOSO, M.H.; QUEIROZ, M.J.; RAMALHO, M.T.; CAMPOS, A.M. Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures. **Chemosphere**, v. 38, p. 2455-2460, 1999.

MARTINS, M.A.; FERREIRA, I.C.; SANTOS, I.M.; QUEIROZ, M.J.; LIMA, N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 91-98, 2001.

MARTINS, M.A.; LIMA, N.; SILVESTRE, A.J.; QUEIROZ, M.J. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, v. 52, p. 967-973, 2003.

MARTINS, M.A.; QUEIROZ, M.J.; SILVESTRE, A.J.; LIMA, N. Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Research Microbiology**, v. 153, p. 361-368, 2002.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MATSUMOTO, S.T. ; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I. ; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. . Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MATSUMOTO, S.T., MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential of the water river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**. v. 69, p. 399-408. 2004.

MATSUOKA, A.; TADA, A.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; ÖNFELT, A.; WAKABAYASHI, K. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (azo dyes) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. **Mutation Research**, v. 493, p. 75-85, 2001.

MBULIGWE, S.E. Comparative treatment of dye-rich wastewater in engineered wetland systems (EWSs) vegetated with different plants. **Water Research**, v. 39, p. 271-280, 2005.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; SMYTH, W.F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 81-87, 2001.

MEEHAN, C.; BANAT, I.M.; MCMULLAN, P.; NIGAM, F.; SMYTH, F.; MARCHANT, R. Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluveyromyces marxianus* IMB3. **Environmental International**, v. 26, p. 75-79, 2000.

MICHAELS, G.B; LEWIS, D.L. Sorption and toxicity of azo and triphenyl methane dyes to aquatic microbial populations. **Environmental Contaminants and Toxicology**, v. 34, p. 323-330, 1985.

MIELGO, I; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Research**, v. 36, p. 1896-1901, 2002.

MIGID, H.M.A.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 57-64, 2007.

MILLER, D. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse – man somatic hybrid cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 101, p. 235-243, 1976.

MOAWAD, H.; ABDEL-RAHIM, W.M; KHALAFALLAH, M. Evaluation of biotoxicity of textile dyes using two bioassays. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 218-229, 2003.

MOHAN, S.V.; RAO, N.C.; SRINIVAS, S.; PRASAD, K.K.; KARTHIKEYAN, J. Treatment of simulated Reactive Yellow 22 (azo) dye effluents using *Spirogyra* species. **Waste Management**, v. 22, p. 575-582, 2002.

MORAES, D.S.L. **Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa***. 2000. 158f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

MUKAI, Y.; FRIEBE, B.; GILL, B.S. Comparison of C-banding patterns and *in situ* hybridization sites using highly repetitive and total genomic rye DNA probes of ‘Imperial’ rye chromosomes added to ‘Chinese Spring’ wheat. **Japanese Journal of Genetics**, v. 67, p. 71-83, 1992.

MURRAY, B.G.; BENNETT, M.D.; HAMMETT, K.R.W. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in-situ* hybridization. **Heredity**, v. 68, p. 473-478, 1992.

NAM, S.; RENGANATHAN, V. Non enzymatic reduction of azo dyes by NADH. **Chemosphere**, v. 40, p. 351-357, 2000.

NATARAJAN, A.T.; RAPOSA, T. Heterochromatin and chromosome aberrations. A comparative study of three mouse cell lines with different karyotype and heterochromatin distributions. **Hereditas**, v. 80, p. 83-90, 1975.

NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial Process for the Decolorization of Textile Effluent Containing Azo, Diazo and Reactive Dyes. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 435-442, 1996.

NONY, C.R.; BOWMAN, M.C.; CAIRNS, T.; LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P. Metabolism studies of an azo dye and pigments in the hamster based on analysis of the urine for the potentially carcinogenic aromatic amines. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 4, p. 132-140, 1980.

NOVOTNÝ, C.; DIAS, N.; KAPANEN, A.; MALACHOVÁ, K.; VÁNDROVCOVÁ, M.; ITÄVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, p. 1436-1442, 2006.

NUTI RONCHI, V.; BONATTI, S.; TURCHI, G. Preferential localization of chemically induced breaks in heterochromatic regions of *Vicia faba* and *Allium cepa* chromosomes. I. Exogenous thymidine enhances the cytologic effects of 4-epoxyethyl-1,2-epoxy-cyclohexane. **Environmental and Experimental Botany**, v. 26, p. 115-126, 1986.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface water: A review. **Mutation Research**, v. 567, p. 109-149, 2004.

OLIVEIRA, D.P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais – um estudo de caso**. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, D.P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais – um estudo de caso**. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v. 626, p. 135-142, 2007.

OLLGAARD, H.; FROST, L.; GALSTER, J.; HANSEN, O.C. **Survey of azo-colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects**. Denmark: Ministry of Environment and Energy, 1998.

O'NEILL, C; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; LOURENCO, N.D.; PINHEIRO, H.M.; DELÉE W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1009-1018, 1999.

ORANUSI, N.A.; OGUGBUE, C.J. Degradation of sulphonated azo dyes by *Pseudomonas* sp. **Journal of Applied Science and Environmental Management**, v. 5, p. 13-17, 2001.

ÖZTÜRK, A.; ABDULLAH, M.I. Toxicological effect of indole and its azo dye derivatives on some microorganisms under aerobic conditions. **Science of the Total Environment**, v. 358, p. 137-142, 2006.

PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dyestuffs: Part II, Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation test. **Chemosphere**, v. 15, p. 470-491, 1986.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 17-24, 2005.

PARK, J.; SHORE, J. Water for the dyehouse – supply, consumption, recovery and disposal. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v. 100, p. 383-399, 1984.

PASTI-GRIGSBY, M.B.; PASZCZYNSKI, A.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L.; CRAWFORD, R.L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3605-3613, 1992.

PASZCZYNSKI, A.; PASTI, M.B.; GOSZCZYNSKI, S.; CRAWFORD, D.L.; CRAWFORD, R.L. New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 378-384, 1991.

PATHAK, S.; MCGILL, M.; HSU, T.C. Actinomycin D effects on mitosis and chromosomes: sticky chromatids and localized lesions. **Chromosoma**, v. 50, p. 79-88, 1975.

PATHAK, S.; WURSTER-HILL, D.H. Distribution of constitutive heterochromatin in carnivores. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 18, p. 245-254, 1977.

PATTERSON, R.M.; BUTLER, J.S. Tartarazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 20, p.461-465, 1982.

PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, v. 58, p. 179-196, 2003.

PEDRO, J. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e mutagênico do inseticida Fipronil (Reagente), usando Sistema teste de *Allium cepa***. 2008. 96f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

PEÑA, L.F.M. **Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios**. 1996. 199f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1996.

PENDAS, A.M.; MORAN, P. GARCIA-VASQUEZ, E. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin associations in brown trout. **Chromosome Research**, v. 1, p. 63-67, 1993.

PERCY, A.J.; MOORE, N.; CHIPMAN, J.K. Formation of nuclear abnormalities in rat intestine by benzidine and its biliary metabolites. **Toxicology**, v. 57, p. 217-223, 1989.

PINHEIRO, H.M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, p. 121-139, 2004.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, T. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PLUMB, J.J.; BELL, J.; STUCKEY, D.C. Microbial population associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3226-3235, 2001.

POLICY RESEARCH CENTER FOR ENVIRONMENT AND ECONOMY. **The 3<sup>rd</sup> Meeting of the 2<sup>nd</sup> Phase of CCICED Impacts of Environmental Standards and Requirements in EU Countries on China's Textile Industry**, 1999.

PRIVAL, M.J.; MITCHELL, V.D. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. **Mutation Research**, v. 97, p. 103-116, 1982.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas**. 1978. 276f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Complutense, Madrid, 1978.

RAFII, F.; HALL, J.D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 35, p. 897-901, 1997.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON, M.A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 444, p. 175-180, 1999.

RAMALHO, P.A.; CARDOSO, M.H.; CAVACO-PAULO, A.; RAMALHO, M.T. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2279-2288, 2004.

RAMALHO, P.A.; PAIVA, S.; CAVACO-PAULO, A.; CASAL, M.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T. Azo reductase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of the plasma membrane ferric reductase. **Applied and Environmental Technology**, v. 71, p. 3882-3888, 2005.

RAMALHO, P.A.; SCHOLZE, H.; CARDOSO, M.H.; RAMALHO, M.T.; OLIVEIRA-CAMPOS, A.M. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 848-854, 2002.

RANK, J.; JENSEN, A.G.; SKOV, B.; PEDERSEN, L.H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Rondoup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the bone



marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v. 300, p. 29-36, 1993.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 136, p. 13-18, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v.312, p.17-24, 1994.

RAZO-FLORES, E.; DONLON, B.; FIELD, J.; LETTINGS, G. Biodegradability of N-substituted aromatics and alkylphenols under methanogenic conditions using granular sludge. **Water Science Technology**, v. 33, p. 47-57, 1996.

REEVES, B.R.; MARGOLES, C. Preferential location of chlorambucil-induced breakage in the chromosomes of normal human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 26, p. 205-208, 1974.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Brasil: ULBRA, 2003. 355p.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

ROWLAND, R.E. Chromosome banding and heterochromatin in *Vicia faba*. **Theoretical and Applied Genetics: International Journal of Plant Breeding Research**, v. 60, p. 275-280, 1981.

ROWLEY, J.D. Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. **Cancer Research**, [S.l.], v. 44, p. 3159-3161, 1984.

SCHLIEPHAKE, K.; MAINWARING, D.E.; LONERGAN, G.T.; JONES, I.K.; BAKER, W.L. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 100-107, 2000.

SELVAM, K.; SWAMINATHAN, K.; CHAE, K.S. Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora sp.* **Bioresource Technology**, v. 88, p. 115-119, 2003.

SHAL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, v. 22, p. 107-119, 1991.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, v. 2, p. 107-119, 1991.

SHAUL, G.M.; LIEBERMAN, R.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Treatability of water soluble azo dyes by the activated sludge process. **Proceedings of the Industrial Wastes Symposia WPCF**, [s.n.], p. 1-18, 1986.

SILVA, J.; FONSECA, M.B. **Genética Toxicológica**. 1 ed. Brasil: Alcance, 2003. 471p.

SLOKAR, Y.M.; LEMARECHAL, A.M. Methods for decoloration of textile wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 37, p. 335-356, 1998.

SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397-2401, 1992.

SRIVASTAVA, P.N.; PRAKASH, A. Bioaccumulation of heavy metals by algae and weath plants fed by textile effluents. **Journal of Industrial Pollution Control**, v. 7, p. 25-30, 1991.

STIBOROVA, M.; FREI, E.; SCHMEISER, H.H. Comparison of cytochrome P-450 and peroxidase-mediated activations of carcinogenic azo dyes and *N*-nitrosamines. **Gen Physiol. Biophys.**, v. 11, p. 489-498, 1992.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 69-80, 2001.

SWAMY, J.; RAMSAY, J.A. The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 130-137, 1999.

TEKERE, M.; MSWAKA, A.Y.; ZVAUYA, R.; READ, J.S. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 420-426, 2001.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Review of the literature on bivalves cytogenetics in the last ten years. **Cahiers de Biologie Marine**, v. 43, p. 17-26, 2002.

TRINDADE, R.C.; ANGELIS, D.F.; CAMARGO, A.T. Estudos sobre adsorção de compostos azóicos por leveduras do gênero *Rhodotorula*. In: **Simpósio Nacional de Fermentação, Programas e Resumos de Comunicações**. UEL, Londrina, Paraná, p. 10. 1986.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBERIO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007.

TSUTSUI, T.; MCLCHLAN, J.A.; BARRET, J.C. Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: A possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. **Cancer Research**, [S.l.], v. 43, p. 3814-3821, 1983.

TUNA, M.; VOGEL, K.P.; GILL, K.S.; ARUMUGANATHAN, K. C-Banding analyses of *Bromus inermis* genome. **Crop Science**, v. 44, p. 31-37, 2004.

TÜRKOĞLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 626, p. 4-14, 2007.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Aerobic and anaerobic treatment of C.I. Disperse Blue 79**. US Department of Commerce, National Technical Information Service (NTIS), I and II, EPA/600/2-89/051 (PB 90-111642), 1989.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Best Management Practices for Pollution Prevention in the Textile Industry**. Office of Research and Development. EPA/625/R-96/004, 1996.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECH, C.M.; SATO, M.I.Z.; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, v. 54, p. 1589-1597, 2004.

USEPA, 1994. Disponível em: <<http://www.epa.gov/EPA-ASTE/1994/December/Day-22/pr-98.html>> Acesso em: 03 de maio de 2008.

USEPA. 2008. Disponível em: <<http://www.epa.gov/emergencies/content/cameo/help/Appendix10.html>> Acesso em: 12 de setembro de 2008.

VAN DER ZEE, F.P. **Anaerobic azo dye reduction**. 2002. 142f. Tese (Doutorado) – Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2002.

VAN DER ZEE, F.P.; BISSCHOPS, I.A.; BLANCHARD, V.G.; BOUWMAN, R.H.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. **Water Research**, v. 37, p. 3098-3109, 2003.

VAN DER ZEE, F.P.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. **Chemosphere**, v. 44, p. 1169-1176, 2001.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida Atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 105f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

VENTURINI, S.; TAMARO, M. Mutagenicity of anthraquinone and azo dyes in Ames *Salmonella typhimurium* test. **Mutation Research**, v. 68, p. 307-312, 1979.

VITOR, V. **Emprego da linhagem selvagem de *Candida albicans* isolada de efluente industrial para a avaliação da biosorção/biodegradação do corante azóico “Direct Violet 51”**. 2005, 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

- VOGEL, E.W. Assessment of chemically-induced genotoxic events. **Prospectives and Limitations**, v. 2, p. 24, 1982.
- VOSA, C.G. Plant chromosome banding and cytotaxonomy. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. In: **I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas**. Piracicaba, p. 17-25. 1984.
- WEBER, E.J.; ADAMS, R.L. Chemical – and sediment – mediated reduction of the azo dye disperse blue 79. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 1163-1170, 1995.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Adv**, v. 22, p. 161-187, 2003.
- WOLLIN, K.M., GORLITZ, B.D. Comparison of genotoxicity of textile dyestuffs in *Salmonella* mutagenicity assay, in vitro micronucleus assay, and single cell gel/comet assay. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 23, p. 267-278, 2004.
- WONG, P.K.; YUEN, P.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. **Water Research**, v. 30, p. 1736-1744, 1996.
- YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 109-114, 2003.
- YOO, E.S. Kinetics of chemical decolorization of the azo dye C.I. Reactive Orange 96 by sulfide. **Chemosphere**, v. 47, p. 925-931, 2002.
- YUNIS, J.J.; YAMINEH, W.G. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Structural DNA of eukaryotes may support and protect genes and aid in speciation. **Science**, v. 74, p. 1200-1209, 1971.
- ZAOYAN, Y.; KE, S.; GUANGLIANG, S.; FAN, Y.; JINSHAN, D.; HUANIAN, M. Anaerobic-aerobic treatment of dye wastewater by combination of RBC with activated sludge. **Water Science and Technology**, v. 26, p. 2093-2096, 1992.
- ZHAO, X.; HARDIN, I.R.; HWANG, H-M. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 57, p. 1-6, 2006.
- ZHOU, W.; ZIMMERMANN, W. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. **FEMS Microbiol Letters**, v. 107, p. 157-161, 1993.
- ZIMMERMANN, T.; KULLA, H.G.; LEISINGER, T. Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. **Eur J Biochem**, v. 129, p. 197-203, 1982.
- ZISSI, U.; LYBERATOS, G. Azo-dye Biodegradation under Anoxic Conditions. **Water Science Technology**, v. 34, p. 495-500, 2000.

ZOLLINGER, H. **Color–Chemistry–Synthesis: Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments**. 1 ed., New York: VCH Publishers, 1987. 310p.

---

**Ms. Bruna de Campos Ventura**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales**