

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/12/2018.

**Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria
têxtil e dos corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* em
roedores**

Fábio Henrique Fernandes

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Júlio de Mesquita Filho
Instituto de Biociências de Botucatu**

**Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria
têxtil e dos corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* em
roedores**

Doutorando: Fábio Henrique Fernandes

Orientadora: Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética). Área de concentração: Mutagênese.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Fernandes, Fábio Henrique.

Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria têxtil e dos corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* em roedores / Fábio Henrique Fernandes. – Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu.

Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori

CAPES: 20206003

1. Corantes sintéticos. 2. Mutagênese. 3. Células germinativas. 4. Carcinógenos. 5. Cólon (Anatomia) - Doenças. 6. Monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Azo-corantes; Carcinogênese de cólon; Instabilidade genômica; Monitoramento ambiental; Mutagênese em células germinativas.

Aos meus amorosos pais, **Vicente Fernandes** e **Marli Coutinho da Rocha Fernandes**. Apesar de ter estudado praticamente toda a minha vida, as lições mais importantes que eu aprendi foram ensinadas por eles.

À minha irmã **Aline Mirella Fernandes** pelo carinho incondicional e à minha sobrinha **Sofia Fernandes Medina** por ter mostrado – mesmo sem palavras – que o mundo pode ser perfeito.

À minha noiva, **Aline Freitas Vendrame** pelo amor e companheirismo de sempre.

Amo vocês



Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori por ter me dado a grande honra de fazer parte do seu convívio. Ao longo desses quatro anos fui contemplado com o que há de melhor de ciência e afeto. Suas perenes contribuições têm sido essenciais para minha formação como cientista. Muito obrigado pelo incentivo, confiança, disponibilidade e sugestões. Foi uma grande satisfação trabalhar com você nesse Projeto.

Ao meu supervisor Prof. Dr. Eduardo Bustos-Óbregon (*in memoriam*) pelo aprendizado, amizade e estrutura no *Laboratório de Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile*, durante o doutorado sanduiche.

À Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro pela gentil e primordial colaboração desde o início do Projeto, bem como o fornecimento de corantes têxteis purificados. Obrigado por compartilhar seu conhecimento e entusiasmo comigo.

Às Professoras Doutoras Maria Aparecida Marchesan Rodrigues (FMB – UNESP) e Noeme Sousa Rocha (FMVZ – UNESP) pelo norte na interpretação dos dados estereoscópios de cólon e histopatológicos do fígado, respectivamente.

Ao Sr. Paulo César Georgete pelo fundamental suporte técnico e amizade no biotério do Departamento de Patologia – FMB/UNESP.

À Assessora Estatística Profa. MSc. Eloisa Elena Paschoalinotte por auxílio no tratamento estatístico dos dados obtidos pelo Teste do Micronúcleo e a toda equipe do Escritório de Apoio à Pesquisa – EAP – UNESP.

Às Doutoras Maria Valnice Boldrin Zanoni e Bianca Ferreira da Silva pela realização das análises físico-químicas das amostras de água estudadas no presente estudo.

Aos integrantes do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes (LEAL), Faculdade de Tecnologia – UNICAMP, pela importante ajuda na coleta das amostras de água do presente estudo.

À Jhennifer Rebecca Fernandes Cal pelo auxílio na análise das lâminas do Ensaio do Cometa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) nas figuras dos Assistentes Administrativos Davi Barcellos de Oliveira Müller e Luciene Tobias Jerônimo e do Conselho do referido Programa pela presente atenção e auxílio.

A todos os integrantes do Laboratório de Toxicogenômica & Nutrigenômica – OMICS que ao longo desses 4 anos contribuíram para minha formação: Bruna Cristina Jeronimo, Babatounde Romuald Houndjo, Bruno César Ottoboni Luperini, Caroline Beltrami, Danielle Cristina de Almeida Dionízio, Elaine Aparecida de Camargo, Gabriela

Nogueira Bittencourt, Glenda Nicioli da Silva, Helenice de Fatima de Lego Marcello, João Paulo Castro Marcondes, Joara de Paula Campos, Luciana Maria Feliciano, Maruhen Amir Datsch Silveira, Pablo Felipe Bertolini Andrade, Raphael Toledo, Renato Paschoal Prado, Tathiana Silveira Dorini, Thyego Mychell Moreira Santos e Vanessa Lorenço Peresi.

Em adição, agradeço especialmente aqueles membros que me ajudaram incondicionalmente durante a realização desse projeto e que, além disso, criaram um laço covalente de amizade para toda uma vida. Gratidão é a palavra que chegou mais perto do que sinto por vocês: André Luiz Ventura Sávio, Brenda Anfilo, Carla Carolina Munari, Jhennifer Rebecca Fernandes Cal, Juliana Lara, Leonardo da Cunha Menezes Souza e Mario Otávio Botasso Nasciutti.

Agradeço ainda aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação e aos de longa data que sempre me apoiaram e deixaram a caminhada mais agradável: Ana Paula Machado, Cibele Borges dos Santos, Cleusa Rocha Gaban, Danilo Tófoli, Mariana Acosta Rosa de Almeida, Mayker Lázaro Dantas Miranda, Muryel Furtado de Barros, Tiani Machado Faria de Souza, Paulo Ricardo da Silva Oliveira, Ricieri Andrella Neto, Viviane Fagundes de Mattos e Wesley de Oliveira Souza.

Minha passagem pelo Chile, além de experiências científicas, também me proporcionou conhecer excelentes amigos: Alvaro Allan Vargas Cisternas, Rodrigo Vargas Cisternas, Nuvia Cisternas, Matias Vargas Ramirez, Karen García Riquelme, Joaquin Rivas Rojas Daniela Diez, Ricardo Hartley Belmar e Juan Fernandez. *Muchas gracias.*

Agradeço às agências financiadoras, CAPES e *Programa Latinoamericano de Investigación en Salud Sexual y Reproductiva*/Organização Mundial da Saúde (PLISSER/OMS) pelas bolsas concedidas, e a FAPESP (Projeto Temático; Processo: 08/10449-7) e CNPq pelos auxílios a pesquisa.

Aos meus familiares e à minha noiva, expresso meu amoroso agradecimento por compreenderem que a distância geográfica, por vezes necessária, nunca foi sinônima de ausência.

Finalmente, sou grato a Deus e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste estudo. As palavras acima, embora redigidas com exímio carinho, pouco traduzem meu sentimento e reconhecimento.

Muitíssimo obrigado!

“Se eu enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton

SUMÁRIO

<u>Lista de Figuras</u>	<u>I</u>
<u>Lista de Tabelas</u>	<u>III</u>
<u>Lista de Abreviaturas e Siglas</u>	<u>IV</u>
<u>Resumo</u>	<u>V</u>
<u>Abstract</u>	<u>VI</u>
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>2. REVISÃO DA LITERATURA</u>	<u>3</u>
2.1 <i>Compostos corantes</i>	3
2.2 <i>Monitoramento ambiental</i>	6
2.3 <i>Mutagênese em células somáticas e germinativas</i>	9
<u>3. HIPÓTESE DO ESTUDO</u>	<u>12</u>
<u>4. OBJETIVOS</u>	<u>12</u>
4.1 <i>Objetivo geral</i>	12
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	12
<u>5. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>13</u>
5.1 <i>Potencial carcinogênico de águas sob influência de atividades têxteis</i>	13
5.1.1 <i>Coleta das amostras</i>	13
5.1.2 <i>Análises físico-químicas</i>	13
5.1.3 <i>Animais</i>	15
5.1.4 <i>Delineamento experimental</i>	15
5.1.5 <i>Teste de focos de criptas aberrantes (FCA)</i>	16
5.1.6 <i>Análise estatística</i>	17
5.2 <i>Avaliação toxicogenética e toxicogenômica de corantes têxteis isolados</i>	17
5.2.1 <i>Corantes azoicos</i>	17
5.2.2 <i>Animais</i>	17
5.2.3 <i>Delineamento experimental</i>	18
5.2.4 <i>Teste do micronúcleo</i>	20

5.2.5 Teste do cometa	22
5.2.6 Análise de expressão gênica	23
5.2.6.1 Extração e quantificação de RNA	23
5.2.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT) para os genes BAX, BCL2, TNFA e SMAD4	24
5.2.6.3. Análise da expressão gênica por qPCR-RT array	25
5.2.7 Avaliação da toxicidade reprodutiva do corante Disperse Red 1	27
6. RESULTADOS	28
6.1. Amostras de água sob influência de corantes têxteis	28
6.1.1. Análises físico-químicas das amostras de água	28
6.1.2. Parâmetros biométricos	29
6.1.3. Histopatologia de fígado	29
6.1.4. Focos de criptas aberrantes no cólon	30
6.2. Corantes isolados: Disperse Red 1 e Disperse Blue 291	30
6.2.1 Análise macroscópica	30
6.2.2. Mutagenicidade em células de medula óssea	33
6.2.3. Genotoxicidade em células renais e hepáticas	34
6.2.4. Expressão gênica em células hepáticas e sanguíneas	35
7. DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÕES	47
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO I	54
ANEXO II	67
ANEXO III	69
ANEXO IV	73

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estrutura química de corante disperso com o grupo cromóforo – azo (N=N) ao centro, o grupo cromógeno destacado por retângulos e os grupos auxócromos representados pelos substituintes R₁ – R₇. Adaptado de Asplant (1993b). 4
- Figura 2:** Diagramas mostrando as funções e causas biológicas gerais e específicas (hereditário e esporádico) relacionadas ao desenvolvimento e promoção de tumores humanos. Modificado de Negrini et al., (2010). 10
- Figura 3:** Mapas e diagrama indicando os locais de coleta das amostras sob a influência de efluentes de indústria têxtil: local 1, efluente tratado da Estação de Tratamento de Esgoto – Carioba; local 2, Ribeirão Quilombo Americana, São Paulo, Brasil. 14
- Figura 4:** Delineamento experimental para o teste de criptas aberrantes em ratos Wistar. EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético (dose total de 1,85 mg/kg p.c.), por via subcutânea; DMH, 1,2-dimetilhidrazina (dose total de 160 mg/kg p.c.). 16
- Figura 5:** Parâmetros físico-químicos dos corantes azoicos *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291*. As partes das estruturas que apresentam similaridade entre as moléculas estão destacadas em preto. O LogP foi gerado pelo software *ChemDraw Ultra 14.0* (CambridgeSoft Corp., Cambridge, Massachusetts). 18
- Figura 6:** Esquema do delineamento experimental utilizado para avaliação dos corantes têxteis *Disperse Red 1* (DR1) e *Disperse Blue 291* (DB291). *A expressão gênica por PCR *array* foi realizada apenas para o corante DR1. 21
- Figura 7:** Fotomicrografias de fígado de ratos. A e D – controle negativo; B e E animais tratados com amostras de água do Ribeirão Quilombo; C e F animais tratados com água do efluente da Estação de Tratamento de Esgoto. As setas indicam micro e macrovacuolização; as cabeças de seta indicam células com acúmulo de glicogênio. CV, veia centro lobular. Coloração de hematoxilina-eosina; A, B e C – aumento de 200X; D, E e F – aumento de 400X. 29
- Figura 8:** Fotografias do sistema digestivo de camundongos do grupo controle negativo (A) e daqueles tratados com os corantes (B) *Disperse Red 1* (500 mg/kg) e (C e D) *Disperse Blue 291* (500 mg/kg). As setas indicam porção proximal do cólon com acúmulo do corante *Disperse Blue 291*. 30
- Figura 9:** Danos no DNA (% *tail intensity*) de células hepáticas e renais de camundongos tratados com os corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* nas concentrações de 0,5 e 5 µg/kg de peso corpóreo. Controle positivo - MNU (50 mg/kg p.c.); controle veículo - DMSO à 0,5%; controle negativo (CN) – água filtrada. * p<0,05 em relação ao grupo CN. 34

Figura 10: Distribuição dos valores de expressão gênica (*volcano plot*) em hepatócitos de camundongos após a exposição *in vivo* ao corante *Disperse Red 1* (DR1; 0,5 e 5 µg/kg p.c.). Foram considerados com aumento de expressão os genes que apresentaram *fold change* $\geq 1,99$ e $p \leq 0,05$ (*). Os genes endógenos *GAPDH* e *HSP90AB1* foram utilizados para a normalização dos dados. 35

Figura 11: Expressão relativa dos genes *BAX*, *BCL2*, *SMAD4* e *TNFA* em células hepáticas e renais de camundongos 24 h após tratamento com os corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* (0,5 e 5 µg/kg de peso corpóreo – p.c.). Controle veículo, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%; controle negativo, água filtrada; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle negativo ou veículo de diluição. 36

Lista de Tabelas

Tabela I. Nomenclatura e informações complementares das sondas utilizadas para a avaliação toxicogenômica dos corantes têxteis <i>Disperse Red 1</i> e <i>Disperse Blue 291</i>	25
Tabela II. Lista de genes distribuídos em grupos funcionais	26
Tabela III. Parâmetros químicos detectados a partir de amostras de água coletadas do Ribeirão Quilombo e do efluente tratado da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) – Carioba, comparados a valores de referência	28
Tabela IV. Média do consumo de água e ração, do peso corpóreo e de órgãos de ratos tratados com água (0,1, 1 e 10%) do Ribeirão Quilombo e do efluente tratado da Estação de Tratamento de Esgoto (0,1, 1 e 10%)	31
Tabela V. Número médio (\pm DP) de focos de criptas aberrantes (FCA) em cólon de ratos tratados com amostras de água do Ribeirão Quilombo e do efluente da Estação de Tratamento de Esgoto; n = 12 animais/grupo.....	32
Tabela VI. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos (8 animais/grupo) tratados com <i>Disperse Blue 291</i> ou <i>Disperse Red 1</i>	33
Tabela VII. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos (8 animais/grupo) tratados com o <i>Disperse Red 1</i>	34
Tabela VIII. Genes avaliados em células hepáticas (7 animais/grupo) após exposição <i>in vivo</i> ao corante <i>Disperse Red 1</i>	37

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCL2	<i>BCL2, apoptosis regulator</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CYP450	<i>Cytochromes P450</i>
DMH	<i>1,2-Dimethylhydrazine</i>
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F1	<i>Filial 1 hybrid</i>
HepG2	<i>Human Hepatocellular Carcinoma – linhagem celular</i>
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDN	Índice de Divisão Nuclear
IET	Índice do Estado Trófico
IQA	Índice de Qualidade das Águas
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IVA	Índices de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática e de Comunidades Aquáticas
mA	miliampères
MNU	<i>N-methyl-N-nitrosourea</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NCE	<i>Normochromatic Erythrocytes</i>
PCE	<i>Polychromatic Erythrocytes</i>
PCEMN	<i>Polychromatic Erythrocytes Micronucleated</i>
PCU	<i>Platinum Cobalt Units</i>
RTL-W1	<i>Rainbow Trout Liver – Waterloo 1 – linhagem celular</i>
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>
TNFA	<i>tumor necrosis factor α (TNF superfamily, member 2)</i>
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
UNT	Unidades Nefelométricas de Turbidez
μS	microssegundo

RESUMO

As consequências da poluição ambiental não se limitam a danos ao ambiente, mas também atingem diretamente a saúde humana. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde divulgou que um terço da população mundial não tem acesso a água potável e, mesmo quando existe, há o perigo desta conter poluentes nocivos à saúde, e que não foram totalmente eliminados após as etapas de tratamento. Nesse contexto, os possíveis efeitos toxicológicos dos resíduos dos compostos corantes descartados pela indústria têxtil em rios que abastecem cidades vêm sendo investigados, na tentativa de eliminar, ou mesmo reduzir, os riscos para as populações expostas. Assim, este estudo foi delineado com o objetivo de avaliar o potencial carcinogênico de amostras de água sob a influência de atividades têxteis (água do Ribeirão Quilombo – RQ – e do efluente tratado da Estação de Tratamento de Esgoto – ETE – de Americana, SP) em cólon de ratos e o potencial toxicogênico dos corantes sintéticos *Disperse Red 1* (DR1) e *Disperse Blue 291* (DB291) em células de medula óssea, sangue periférico, fígado e rins de camundongos. Foi também investigado o potencial tóxico-reprodutivo do DR1 em células germinativas de camundongos. Os resultados mostraram que a exposição crônica às amostras de água do RQ e do efluente tratado da ETE não induziram lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos, mas foram detectados sinais de hepatotoxicidade. Em relação aos corantes DR1 e DB291 foi observado aumento na frequência de micronúcleos em células de medula óssea. Em concentrações semelhantes às detectadas nos corpos fluviais, apenas o corante DR1 apresentou potencial toxicogênico, tanto pela indução de danos primários no DNA de células hepáticas, como na regulação positiva de genes que promovem bloqueio da apoptose (*BCL2* e *BAX* – sangue), inflamação (*IL1B* - fígado) e controle do ciclo celular (*CDKN1A* - fígado). Em células germinativas, além de alterações na morfologia do espermatozoide e redução da integridade do DNA, o DR1 induziu aumento de danos no DNA em células do testículo de camundongos. Concluindo, os dados mostraram que a exposição aguda a corantes têxteis induz alterações genéticas tanto em células somáticas como germinativas. Essas informações alertam para a necessidade de regulamentação mais rígida para o descarte de corantes sintéticos, sobretudo em regiões de abastecimento de água para o consumo humano.

Palavras-chave: azo corantes; genotoxicidade; hepatotoxicidade; mutagênese ambiental.

ABSTRACT

Environmental pollution is not limited to ecological damage, but also reaches directly the human health. Recently, the World Health Organization reported that about one-third of the world's population does not have access to drinking water and, even when it does, some contaminants may not have been completely eliminated by a conventional treatment. Therefore, the toxicological monitoring of river waters supplying human populations is very important. Currently, the contamination of water by azo dyes used in the textile industry has drawn attention due to their mutagenic potential. This study was designed to evaluate carcinogenic potential of water samples under influence of textile activities (from Quilombo River – QR – and the treated effluent of Carioba Wastewater Treatment Plant – WWTP –, Americana, State of São Paulo, Brazil.), and toxicogenomic activity of the azo dyes Disperse Red 1 (DR1) and Disperse Blue 291 (DB291) in mouse bone marrow, peripheral blood, liver and kidney cells. Additionally, it was investigated the toxic reproductive potential of DR1 on mouse germ cells. The results showed that QR and WWTP effluent samples did not induce preneoplastic lesions in colon of Wistar rats, but hepatotoxic effects were observed. Concerning pure dyes, DR1 and DB291 an increased frequency of micronuclei was observed in mouse bone marrow cells. Furthermore, DR1, at concentrations similar to those detected in the river water, induced DNA damage in liver cells, and acted modulating the expression of genes related to apoptosis (*BCL2* and *BAX* – blood), inflammation (*IL1B* – liver) and cell-cycle control (*CDKN1A* – liver). Toxic and genotoxic effects of DR1 on mouse spermatogenesis, indicating the harmful activity of this dye on reproductive health were also detected. In conclusion, data showed that acute exposure to textile dyes was able to induce histological and genetic changes in rodents.

Keywords: azo dyes; environmental mutagenesis; genotoxicity; hepatotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

A melhoria das condições de vida a partir do século XVIII, após a Revolução Industrial, contribuiu para o crescimento populacional, levando à necessidade de investimentos em novas tecnologias de produção voltadas ao atendimento da crescente demanda por bens e serviços. Tal situação resultou na intensificação da exploração de recursos naturais e, conseqüentemente, no aumento da produção de alimentos industrializados e de poluentes ambientais. Com a globalização e os inúmeros compromissos internacionais para a preservação do meio ambiente e da saúde humana, esperava-se que grande parte dos problemas mundiais seria solucionada. No entanto, isso não vem ocorrendo da forma como que se desejava, e o que se assiste hoje é a degradação de ecossistemas, com o esgotamento de recursos naturais e desastres ecológicos.

As conseqüências da poluição ambiental não se limitam a danos ao ambiente, mas também atingem diretamente a saúde humana. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstraram que, em 2012, aproximadamente sete milhões de pessoas morreram em decorrência da poluição do ar, e que 80% das doenças que acometeram a população dos países em desenvolvimento foram provocadas por água contaminada (WHO, 2014). Mais recentemente, a OMS divulgou que um terço da população mundial não tem acesso à água potável e, mesmo quando existe, há o perigo desta conter substâncias nocivas à saúde, as quais não foram totalmente eliminadas após as etapas de tratamento (WHO, 2015).

Uma forma comum de poluição das águas é a causada pelo lançamento de dejetos industriais em rios, lagos e mares. De fato, a indústria constitui um dos setores de atividade mais poluidores da água, uma vez que não existem processos de fabrico totalmente limpos. Nesse contexto, a indústria têxtil possui um dos processos de maior geração de poluentes, contribuindo quantitativa e qualitativamente para a poluição do meio ambiente, em

especial por meio do descarte de compostos corantes em efluentes que não são corretamente tratados. De forma semelhante, corantes sintéticos, como vários dos utilizados pela indústria alimentícia, são também considerados importantes agentes causadores de efeitos deletérios à saúde.

Os corantes sintéticos são compostos orgânicos extensivamente utilizados em diversas áreas, dentre as quais vários ramos da indústria têxtil, farmacêutica, cosmética, de plásticos e couros, fotográfica, automobilística, de papel e a alimentícia. Em substituição a corantes naturais extraídos do reino animal, vegetal e mineral, compostos sintéticos com propriedades coloríferas são utilizados desde 1856, após a síntese do primeiro corante artificial por W. H. Perkin, na Inglaterra. A enorme popularidade desses compostos em detrimento aos corantes naturais é hoje justificada pelo seu menor custo, diversidade de cores e tonalidades, maior grau de pureza, alto controle da fidelidade da cor e maior potencial de fixação (Gürses et al. 2016a).

No entanto, nas últimas décadas, a literatura tem relatado os efeitos tóxicos de compostos corantes, incluindo aqueles anteriormente autorizados para comercialização por agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Este problema vem se agravando, pois não são totalmente conhecidos os mecanismos de ação desses compostos e sob quais condições apresentam efeito nocivo à saúde (Carocho et al. 2014). Nesse cenário, agências internacionais como a *European Food Safety Authority* (EFSA) têm direcionado recursos financeiros e esforços no sentido de estabelecer valores confiáveis de Ingestão Diária Aceitável (IDA), especialmente para os corantes alimentares, na tentativa de prevenir a toxicidade dessas substâncias. Por outro lado, o monitoramento constante da presença de resíduos de compostos corantes no ambiente tem também merecido atenção de governos e da comunidade científica. Nesse sentido, agências de controle ambiental têm recomendado a utilização de uma bateria mínima de testes

laboratoriais para garantir a ausência de efeitos tóxicos de compostos que serão descartados no ambiente.

8. CONCLUSÕES

Os dados obtidos a partir da exposição a corantes têxteis permitiram as seguintes conclusões:

- 1- as amostras do Ribeirão Quilombo e do Efluente da ETE – Carioba não induziram a formação de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos, mas provocaram sinais de toxicidade hepática;
- 2- os corantes *Disperse Red 1* (DR1) e *Disperse Blue 291* (DB291) apresentaram efeito mutagênico em células de medula óssea de camundongos;
- 3- em concentrações próximas às encontradas nos rios, o corante DR1 induziu lesões primárias no DNA de células de hepáticas;
- 4- o DR1 induziu alterações na expressão de genes relacionados a apoptose em células sanguíneas, e ao processo inflamatório e proliferação do ciclo celular em células do fígado;
- 5- o DR1 foi capaz de promover toxicidade reprodutiva por meio de alterações toxicogênicas e morfológicas nos testículos e espermatozoides;

Finalizando, os resultados do presente estudo mostraram que a exposição aguda a corantes têxteis induz alterações genéticas. Essas informações poderão fornecer subsídios para a elaboração de políticas para a regulamentação do descarte de corantes sintéticos utilizados pela indústria têxtil.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2014. *Molecular Biology of the Cell*. 6 edition. [place unknown]: Garland Science.

Al-Eryani L, Wahlang B, Falkner KC, Guardiola JJ, Clair HB, Prough RA, Cave M. 2015. Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicol Pathol*. 43:482–487.

Alkaya E, Demirer GN. 2014. Sustainable textile production: a case study from a woven fabric manufacturing mill in Turkey. *J Clean Prod*. 65:595–603.

Alves de Lima RO, Bazo AP, Salvadori DMF, Rech CM, de Palma Oliveira D, Umbuzeiro GA. 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 626:53–60.

Asplant JR. 1993a. Chapter 14: Pigments as textile colorants: pigmenting or pigmentation. *Text Chem Color*. 25:31–37.

Asplant JR. 1993b. Chapter 9: The structure and properties of disperse dyes and related topics. *Text Chem Color*. 25:21–25.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. Appendix G: Calculating Exposure Doses | PHA Guidance Manual. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/hac/PHAManual/appg.html>

Ball P. 2006. Chemistry: Perkin, the mauve maker. *Nature*. 440:429–429.

Barber RC, Hickenbotham P, Hatch T, Kelly D, Topchiy N, Almeida GM, Jones GDD, Johnson GE, Parry JM, Rothkamm K, Dubrova YE. 2006. Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene*. 25:7336–7342.

Benotti MJ, Stanford BD, Snyder SA. 2010. Impact of drought on wastewater contaminants in an urban water supply. *J Environ Qual*. 39:1196–1200.

Bird RP. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett*. 37:147–151.

Burlinson B. 2012. The in vitro and in vivo comet assays. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 817:143–163.

Caritá R, Marin-Morales MA. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*. 72:722–725.

Carneiro PA, Umbuzeiro GA, Oliveira DP, Zanoni MVB. 2010. Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. *J Hazard Mater*. 174:694–699.

Carocho M, Barreiro MF, Morales P, Ferreira ICFR. 2014. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 13:377–399.

Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat Res Mutat Res.* 704:12–20.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2009. Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2015a. Índices de Qualidade das Águas.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2015b. Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2015c. Chuva nas Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2016. Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo.

Chequer FMD, Angeli JPF, Ferraz ERA, Tsuboy MS, Marcarini JC, Mantovani MS, de Oliveira DP. 2009. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 676:83–86.

Chequer FMD, Lizier TM, de Felício R, Zanoni MVB, Deboni HM, Lopes NP, Marcos R, de Oliveira DP. 2011. Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye Disperse Red 1. *Toxicol In Vitro.* 25:2054–2063.

Chung K-T, Cerniglia CE. 1992. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. *Mutat Res Genet Toxicol.* 277:201–220.

CONAMA - Ministério do Meio Ambiente. 2005. Resolução no357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

CONAMA - Ministério do Meio Ambiente. 2011. Resolução no430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

DeMarini D. 2012. Declaring the existence of human germ-cell mutagens. *Environ Mol Mutagen.* 53:166–172.

Dinarello CA. 2011. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 41:1203–1217.

Dubrova YE, Plumb M, Gutierrez B, Boulton E, Jeffreys AJ. 2000. Genome stability: Transgenerational mutation by radiation. *Nature.* 405:37–37.

European Commission. 2003. Reference Document on Best Available Techniques for the Textiles Industry (BREF). Available from: http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/txt_bref_0703.pdf

Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N, Migliore L, Palitti F, Natarajan AT, Kirsch-Volders M. 2016. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutat Res Mutat Res.*:In press.

Ferguson LR, Chen H, Collins AR, Connell M, Damia G, Dasgupta S, Malhotra M, Meeker AK, Amedei A, Amin A, et al. 2015. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol.* 35, Supplement:S5–S24.

Ferguson LR, Denny WA. 2007. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 623:14–23.

Fernandes FH, Bustos-Obregon E, Salvadori DMF. 2015. Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. *Reprod Toxicol.* 53:75–81.

Ferraz ERA, Umbuzeiro GA, de-Almeida G, Caloto-Oliveira A, Chequer FMD, Zanoni MVB, Dorta DJ, Oliveira DP. 2011. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and Daphnia acute toxicity test. *Environ Toxicol.* 26:489–497.

G1. 2015. Sem tratar esgoto, indústrias operam com licença vencida em Americana. *Camp E Reg.* Available from: <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/2015/10/sem-tratar-egoto-industrias-operam-com-licenca-vencida-em-americana.html>

Geacintov NE, Broyde S, editors. 2010. *The chemical biology of DNA damage.* Weinheim: Wiley-VCH.

Gontijo A, Tice RR. 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editors. *Mutagênese Ambient.* Canoas: ULBRA; p. 247–279.

Gray LE, Ostby JS. 1993. The effects of prenatal administration of azo dyes on testicular development in the mouse: a structure activity profile of dyes derived from benzidine, dimethylbenzidine, or dimethoxybenzidine. *Toxicol Sci.* 20:177–183.

Gray Jr LE, Ostby JS, Kavlock RJ, Marshall R. 1992. Gonadal effects of fetal exposure to the azo dye congo red in mice: infertility in female but not male offspring. *Fundam Appl Toxicol.* 19:411–422.

Guaratini CC, Zanoni MVB. 2000. Corantes têxteis. *Quím Nova.* 23:71–78.

Gürses A, Açıkıldız M, Güneş K, Gürses MS. 2016a. Historical Development of Colorants. In: *Dyes Pigments.* Springer International Publishing; 1ª Edição. p. 1–12.

Gürses A, Açıkıldız M, Güneş K, Gürses MS. 2016b. Classification of dye and pigments. In: *Dyes Pigments.* Springer International Publishing; 1ª Edição. p. 31–45.

- Gürses A, Açıkyıldız M, Güneş K, Gürses MS. 2016c. Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. In: Dyes Pigments. Springer International Publishing; 1ª Edição. p. 13–29.
- Kanarek N, Grivennikov SI, Leshets M, Lasry A, Alkalay I, Horwitz E, Shaul YD, Stachler M, Voronov E, Apte RN, et al. 2014. Critical role for IL-1 β in DNA damage-induced mucositis. *Proc Natl Acad Sci.* 111:E702–E711.
- Keller PF. 2004. Competição Global & Cooperação Local: uma análise das relações interfirmas no cluster têxtil de Americana - SP. *Enfoques.* 3:1–26.
- Koh J. 2011. Dyeing with Disperse Dyes. In: *Textile Dyeing.* 1ª Edição. Editora InTech. 392 p.
- Krishna G, Hayashi M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 455:155–166.
- Laubenthal J, Zlobinskaya O, Poterlowicz K, Baumgartner A, Gdula MR, Fthenou E, Keramarou M, Hepworth SJ, Kleinjans JCS, Schooten F-J van, et al. 2012. Cigarette smoke-induced transgenerational alterations in genome stability in cord blood of human F1 offspring. *FASEB J.* 26:3946–3956.
- Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS-J, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DMK. 2007. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 33:448–460.
- Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, Wyrobek AJ. 2015. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci Rep.* 5:1–7.
- Marchetti F, Bishop JB, Lowe X, Generoso WM, Hozier J, Wyrobek AJ. 2001. Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 98:3952–3957.
- Mathur N, Bhatnagar P, Verma H. 2006. Genotoxicity of vegetables irrigated by industrial wastewater. *J Environ Sci.* 18:964–968.
- Mohamed E-SA, Song W-H, Oh S-A, Park Y-J, You Y-A, Lee S, Choi J-Y, Kim Y-J, Jo I, Pang M-G. 2010. The transgenerational impact of benzo(a)pyrene on murine male fertility. *Hum Reprod.* 25:2427–2433.
- Moulin M-C, Daoust R. 1971. Glucose-6-phosphatase activity in rat liver parenchyma during azo-dye carcinogenesis. *Int J Cancer.* 8:81–85.
- Murray A, Mortimer K. 1971. Carrier Dyeing. *Rev Prog Color Relat Top.* 2:67–72.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. 2010. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:220–228.
- OECD. 2014. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. Available from: <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264224292-en>

Oliveira DP, Kuhlmann ML, Umbuzeiro GDA. 2006. Evaluation of the Presence of Mutagenic Dyes in Sediments from Cristais River. *Soil Sediment Contam Int J.* 15:455–462.

Oliveira GAR, Ferraz ERA, Chequer FMD, Grando MD, Angeli JPF, Tsuboy MS, Marcarini JC, Mantovani MS, Osugi ME, Lizier TM, et al. 2010. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 703:200–208.

Oliveira GAR, de Lapuente J, Teixidó E, Porredón C, Borràs M, de Oliveira DP. 2016. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. *Environ Toxicol Chem.* 35:429–434.

Proudlock R. 2016. *Genetic toxicology testing a laboratory manual.* Amsterdam: Academic Press is an imprint of Elsevier.

Rajaguru P, Fairbairn LJ, Ashby J, Willington MA, Turner S, Woolford LA, Chinnasamy N, Rafferty JA. 1999. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 444:175–180.

Ribeiro AR, Umbuzeiro G de A. 2014. Effects of a textile azo dye on mortality, regeneration, and reproductive performance of the planarian, *Girardia tigrina*. *Environ Sci Eur.* 26:1–8.

Ribeiro LR. 2003. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editors. *Mutagênese Ambient.* Canoas: ULBRA; p. 173–200.

Teijido O, Dejean L. 2010. Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. *FEBS Lett.* 584:3305–3310.

Tsuboy MS, Angeli JPF, Mantovani MS, Knasmüller S, Umbuzeiro GA, Ribeiro LR. 2007. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicol In Vitro.* 21:1650–1655.

Uliana CV, Garbellini GS, Yamanaka H. 2013. Evaluation of the interactions of DNA with the textile dyes Disperse Orange 1 and Disperse Red 1 and their electrolysis products using an electrochemical biosensor. *Sens Actuators B Chem.* 178:627–635.

Umbuzeiro GA, Freeman H, Warren SH, Kummrow F, Claxton LD. 2005b. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. *Food Chem Toxicol.* 43:49–56.

Umbuzeiro GA, Freeman HS, Warren SH, de Oliveira DP, Terao Y, Watanabe T, Claxton LD. 2005a. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere.* 60:55–64.

Umbuzeiro GA, Roubicek DA, Rech CM, Sato MIZ, Claxton LD. 2004. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures. *Chemosphere.* 54:1589–1597.

Vacchi FI, Albuquerque AF, Vendemiatti JA, Morales DA, Ormond AB, Freeman HS, Zocolo GJ, Zanoni MVB, Umbuzeiro G. 2013. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. *Sci Total Environ.* 442:302–309.

Vacchi FI, Vendemiatti JAS, Brosselin V, Ferreira da Silva B, Zanoni MV, DeMeo M, Bony S, Devaux A, Umbuzeiro GA. 2016a. Combining different assays and chemical analysis to characterize the genotoxicity of waters impacted by textile discharges. *Environ Mol Mutagen.* 57:559–571.

Vacchi FI, Von der Ohe PC, Albuquerque AF de, Vendemiatti JA de S, Azevedo CCJ, Honório JG, Silva BF da, Zanoni MVB, Henry TB, Nogueira AJ, Umbuzeiro G de A. 2016b. Occurrence and risk assessment of an azo dye – The case of Disperse Red 1. *Chemosphere.* 156:95–100.

Watanabe T, Shiozawa T, Takahashi Y, Takahashi T, Terao Y, Nukaya H, Takamura T, Sawanishi H, Ohe T, Hirayama T, Wakabayashi K. 2002. Mutagenicity of two 2-phenylbenzotriazole derivatives, 2-[2-(acetylamino)-4-(diethylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and 2-[2-(acetylamino)-4-(diallylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and their detection in river water in Japan. *Mutagenesis.* 17:293–299.

WHO - World Health Organization. 2014. Seven million premature deaths annually linked to air pollution. WHO. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/#>

WHO - World Health Organization. 2015. Drinking-water, fact sheet n°391. WHO. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en/>

Zocolo GJ, Pilon Dos Santos G, Vendemiatti J, Vacchi FI, Umbuzeiro G de A, Zanoni MVB. 2015. Using SPE-LC-ESI-MS/MS analysis to assess disperse dyes in environmental water samples. *J Chromatogr Sci.* 53:1257–1264.