

**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 sanduíche.

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.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Compostos corantes

O uso de pigmentos pela humanidade é uma prática ancestral que data de cerca de 30 mil anos a.C. As cavernas de *Lascaux*, no atual território francês, são importantes exemplos pré-históricos dessa atividade (Asplant 1993a). Naquele período, o próprio solo (óxido de ferro) e vestígios de fuligem eram utilizados para a produção de pictogramas. Assim, por muito tempo, a humanidade fez uso de compostos corantes de origem vegetal, animal e mineral (Guaratini & Zanoni 2000). Foi apenas em 1856, que surgiu o primeiro corante sintético, a mauveína. Sua descoberta foi acidental e ocorreu em laboratório na residência de William Henry Perkin, jovem britânico de 18 anos, que almejava sintetizar o quinino, único fármaco conhecido na época para o tratamento da malária (Ball 2006). Perkin introduziu, assim, uma nova era na indústria química e, desde então, inúmeros corantes têxteis foram sintetizados. Dados recentes mostram que o mercado mundial de pigmentos e corantes prevê alcançar cerca de 10 milhões de toneladas produzidas até o ano de 2017, impulsionado, sobretudo, pelo crescimento do setor de indústrias usuárias finais (Gürses et al. 2016b). Esses números representam o elevado consumo de compostos com propriedade corante por diversos setores da sociedade, sejam por meio de alimentos, tinturas de cabelo ou vestimentas (informações sobre o perigo toxicogenético desses compostos foram descritas no Capítulo de Livro recentemente publicado – Anexo I).

As indústrias de tecelagem, ramo em constante expansão, têm demandado a síntese de novos corantes e métodos para atender as exigências dos consumidores em relação à diversidade de cores e resistência à exposição à luz, lavagem e transpiração (Guaratini &

Zanoni, 2000). Dentre os corantes têxteis utilizados, os da classe azo (N=N) representam o grupo químico mais importante no processo de coloração de fibras. A Figura 1 mostra a estrutura geral dos principais corantes dispersos da classe monoazo, com destaque para os três principais grupos da molécula: (i) o cromóforo, representado pelo grupo azo – N=N – em posição dominante, é responsável pela intensidade da cor dos compostos; (ii) o cromógeno, que pode ser incolor ou colorido a depender do (iii) grupo auxócromo (R₁ - R₇), que altera tanto o comprimento de onda e influencia na coloração (OH, NH₂ etc) (Gürses et al. 2016c). Essas características garantem versatilidade à estrutura dos corantes por meio de variações que geram centenas de estruturas diferentes. O espectro de cores possíveis se estende desde amarelo neutro, passando por laranja, marrom, vermelho, violeta, azul marinho, até o verde-escuro (Asplant 1993b).

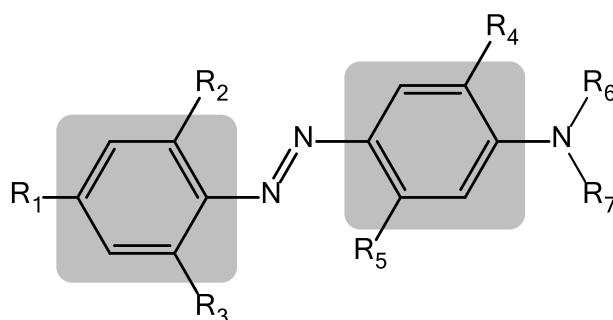


Figura 1: Estrutura química de corante disperso com o grupo cromóforo – azo (N=N) ao centro, o grupo cromógeno destacado por retângulos e os grupos auxócromos representados pelos substituintes R₁ – R₇. Adaptado de Asplant (1993b).

É importante destacar que os corantes azoicos representam mais de 50% do total dos corantes dispersos comercializados em todo o mundo (Koh 2011). São muitas as razões pelas quais o mercado têxtil tem dado preferência a esse grupo de corantes, sendo a principal delas a intensidade peculiar do seu cromóforo (N=N) em termos da capacidade tintorial. Além disso, os corantes da classe azo se destacam pela sua simplicidade

estrutural, que proporciona facilidade de síntese e, por consequência, baixo custo frente a outros tipos de corantes, como a antraquinona e o estirilo (Koh 2011).

Em geral, os corantes azoicos apresentam baixa solubilidade em água, necessitando da adição de agentes de dispersão à mistura, a fim de promover um espalhamento estável das moléculas do corante. O mecanismo básico de coloração por corantes dispersos, intermediado por agentes dispersantes, pode ser resumido em três estágios: (i) em solução aquosa o corante é envolvido por micelas anfipáticas; (ii) em seguida, é feita a transferência do corante para a superfície da fibra; (iii) por fim, o corante adsorvido na fibra difunde-se para o interior da fibra de poliéster (Murray & Mortimer, 1971; Koh 2011).

Ao final do processo de tingimento, caso ocorra o descarte sem o devido tratamento dos efluentes, os corantes azoicos podem alcançar rios, sedimentos, lamas e inclusive atingir populações humanas por meio da contaminação de águas para o abastecimento (Oliveira et al., 2006; Alves de Lima et al. 2007; Carneiro et al. 2010). Essa situação pode ser agravada em períodos de estiagem, devido ao aumento da concentração desses compostos em decorrência da diminuição do volume dos rios (Benotti et al., 2010). Há relatos na literatura que evidenciam que compostos corantes não são completamente removidos por tratamentos convencionais (Carneiro et al. 2010; Oliveira et al. 2010), fato que é agravado em áreas altamente povoadas, onde não há planejamento para o reuso da água.

Além dos possíveis efeitos tóxicos de alguns corantes, outros compostos utilizados no processo de tingimento (agentes dispersantes e antiespumantes, agentes para oxidação e redução, bases, sais, etc) também contribuem para a poluição das águas e do meio ambiente de modo geral (European Commission 2003).

2.2. Monitoramento ambiental

Durante atividade rotineira do Programa de Monitoramento da Qualidade das Águas Superficiais, realizado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), foi detectada atividade mutagênica (teste de Ames) em rio, cujas águas eram utilizadas para o abastecimento humano (Umbuzeiro et al. 2004). Após ampla investigação, o potencial toxicogenético foi atribuído aos compostos corantes lançados por indústria de tingimento de *nylon* e poliéster, instalada há 20 anos na região. Além disso, foi constatado que tanto as amostras de água do efluente, coletadas no local do lançamento dos dejetos, como a 6 km de distância, apresentavam atividade mutagênica (Umbuzeiro et al. 2004; 2005a).

No interior do Estado de São Paulo, está instalado o Polo Têxtil de Americana, cujas atividades representam 85% da produção nacional de tecidos (Keller 2004). Com o intuito de promover o tratamento dos efluentes gerados pelas atividades têxteis, na década de 80, 37 empresas da cidade aderiram a convênio entre o Poder Público (Prefeitura de Americana, Departamento de Água e Esgoto) e o Setor Privado (indústrias geradoras de efluentes), para a criação da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) – Carioba, na confluência dos rios Quilombo e Piracicaba. Com isso, as empresas conveniadas passaram a ter o direito de lançar seus efluentes sem tratamento prévio na ETE. No entanto, desde então, a ETE não expandiu sua capacidade de tratamento, e, em 2015, 60% dos resíduos lançados na Estação eram oriundos das indústrias, resultando na incapacidade de tratamento de esgoto vindos de outras cidades (G1 2015). Outro aspecto que deve ser citado com relação à ETE – Carioba é a ineficiência do sistema para a remoção de compostos corantes (tratamento primário - físico: remoção de sólidos suspensos e secundário - biológico: eliminação de matéria orgânica por lodo ativado) (Vacchi et al., 2016a).

Localizado na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos nº. 5 (UGRHI 5 - Piracicaba, Capivari e Jundiáí), o Ribeirão Quilombo é monitorado, bimestralmente, pela CETESB (cód. CETESB: QUIL03900) para diversos parâmetros, entre os quais temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*), nitrogênio, fósforo e sólidos totais e turbidez, gerando o Índice de Qualidade das Águas (IQA) brutas, que varia de 0 – 100 (IQA; ótimo: 100 – 79, bom: 79 – 51, regular: 51 – 36, ruim 36 – 19 e péssimo: \leq 19) (CETESB 2015a). Nos últimos dois anos, a média do IQA do Ribeirão Quilombo foi considerada, respectivamente, péssima (18) e ruim (24) (CETESB 2015b; 2016). Outro parâmetro preocupante para o Ribeirão Quilombo, refere-se ao Índice do Estado Trófico (IET). Com valores idênticos na média anual de 2014 e 2015, trecho do ribeirão foi classificado como hipereutrófico (IET: 71) (CETESB 2015b; 2016). Os últimos relatórios da CETESB, após avaliação da concentração de contaminantes químicos capazes de induzir toxicidade em organismos aquáticos, enquadraram o Ribeirão Quilombo quanto à qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática e de Comunidades Aquáticas (IVA), como péssima (IVA: 7,2) (CETESB 2015b; 2016).

Alguns estudos complementares aos realizados pela CETESB também mostram a atividade, mutagênica e carcinogênica de águas sob a influência de efluentes têxteis. Foi observado, por exemplo, o aumento de alterações cromossômicas pelo teste com *Allium cepa* (Caritá & Marin-Morales, 2008) e de lesões pré-neoplásicas (criptas aberrantes) no cólon de roedores (Alves de Lima et al., 2007). Além disso, foi descrito que os corantes dispersos podem também interferir nos ciclos biológicos da biota aquática, sobretudo no processo de fotossíntese e na oxigenação pluvial, devido a alteração na penetração da luz (Umbuzeiro et al. 2004). Outro importante aspecto relatado em relação à água de rios é o da contaminação de vegetais por meio da irrigação (Mathur et al. 2006). Recentemente, foi

demonstrado que águas contendo resíduos de corantes têxteis eram também capazes de induzir malformações em larvas e embriões do *zebrafish* (Oliveira et al. 2016).

Dentre os compostos corantes com significativo potencial genotóxico *in vitro*, destacam-se os monozoicos *Disperse Red 1* (DR1) e *Disperse Blue 291* (DB291). Particularmente o DR1 (CAS 2872-52-8), amplamente utilizado na indústria têxtil e detectado em corpos fluviais, mesmo após o tratamento das águas de descarte ainda apresenta atividade tóxica (Vacchi et al. 2013; 2016b). Há dados mostrando que o DR1 é mutagênico em bactéria *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) e que aumenta a frequência de micronúcleos em linfócitos e em células de hepatoma humano (HepG2) *in vitro* (Chequer et al. 2009). A alta toxicidade desse corante foi também detectada em *Daphnia similis* (Ferraz et al. 2011) e em planárias (*Girardia tigrina*) (Ribeiro & Umbuzeiro, 2014). No entanto, são raros os estudos em sistemas *in vivo* e principalmente em células germinativas. Apenas recentemente foi relatado efeito citotóxico e genotóxico do DR1 em epitélio seminífero e espermatozoides de camundongos (Fernandes et al. 2015).

Como mencionado anteriormente, testes isolados não são suficientes para definir a atividade mutagênica e carcinogênica de um composto, a ponto de ser recomendada a não exposição de populações humanas, ou mesmo a suspensão de sua produção. Portanto, no caso do DR1 há, ainda, a necessidade de avaliações mais detalhadas para confirmar seu potencial toxicológico e especialmente para entender seus mecanismos de ação, a fim de que medidas possam ser tomadas para reduzir seu impacto sobre populações expostas e sobre o meio ambiente. Neste ano, Vacchi et al., (2016b) confirmaram que o quociente de risco (QR) para o corante DR1 indica risco potencial para a biota de água doce e a necessidade de investigações mais amplas a fim de estabelecer os limites de exposição.

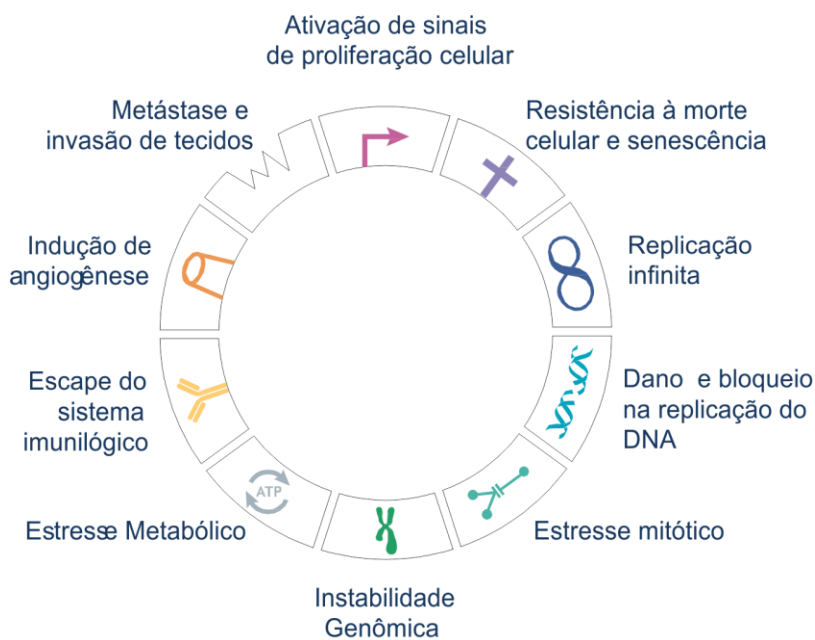
Com relação ao DB291 (CAS 56548-64-2), foi detectado potencial mutagênico pelo teste de Ames (Umbuzeiro et al., 2005b), aumento da frequência de células micronucleadas (HepG2) *in vitro* e de danos primários no DNA (teste do cometa) e aumento do índice apoptótico (Tsuboy et al. 2007). Além disso, o DB291 é molécula precursora do PBTA-7 (da classe do 2-fenilbenzotriazol), potente mutágeno também detectado em águas sob influencia da indústria têxtil (Watanabe et al. 2002). É importante destacar que a atividade mutagênica do DB291 *in vitro* é mediada por enzimas de bioativação metabólica, como a nitroreductase, a *O*-acetiltransferase e o CYP450 (S9) (Umbuzeiro et al., 2005b). Contudo, até o momento, não foi relatado o efeito mutagênico do DB291 em sistemas *in vivo*.

2.3. Mutagênese em células somáticas e germinativas

Mudanças no genoma ocorrem mesmo em ambiente isento de agentes mutagênicos. Essas mutações, denominadas espontâneas, ocorrem em taxas extraordinariamente baixas, (cerca de três mutações a cada divisão de células humanas), devido à eficiente atividade do sistema de reparo do DNA (Alberts et al. 2014). No entanto, os organismos estão constantemente expostos a substâncias nocivas, as quais podem induzir aumento substancial da frequência de mutações e outras alterações celulares. Alterações na sequência do DNA ou em cromossomos geram instabilidades genômicas que podem levar ao desenvolvimento de diversas doenças, dentre as quais o câncer (Figura 2), e de anomalias que podem ser transmitidas às gerações seguintes (Ferguson et al. 2015).

Até hoje, os danos induzidos no material genético de células somáticas receberam maior atenção, não apenas pelo efeito mais imediato ao indivíduo, mas, também, pela maior facilidade de detecção. Em contraste aos inúmeros testes para avaliação do potencial mutagênico em células somáticas, há um número menor de metodologias para células germinativas (DeMarini 2012).

Características gerais do câncer



Câncer hereditário



Câncer esporádico

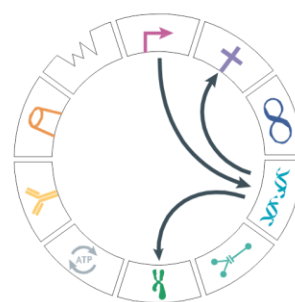


Figura 2: Diagramas mostrando as funções e causas biológicas gerais e específicas (hereditário e esporádico) relacionadas ao desenvolvimento e promoção de tumores humanos. Modificado de Negrini et al., (2010).

Contudo, é crescente o interesse de pesquisadores em padronizar técnicas que permitam uma avaliação segura das alterações genéticas induzidas em células germinativas, em virtude das possíveis consequências para as gerações futuras. O risco de desenvolvimento cada vez mais precoce de doenças geneticamente relacionadas pode causar sério impacto à qualidade de vida da descendência de populações expostas a agentes genotóxicos e aumentar enormemente os gastos com saúde.

Dentre os testes atualmente utilizados para a avaliação de danos em células do sistema reprodutivo, estão aqueles realizados em gametas masculinos. Análises em espermatócitos e espermatozoides podem fornecer informações importantes para o estabelecimento do potencial de risco genético para a descendência (Dubrova et al. 2000;

Mohamed et al. 2010; Laubenthal et al. 2012). O risco de transmissão paterna de lesões cromossômicas hereditárias depende da susceptibilidade dos tipos de células germinativas atingidas no momento da exposição paterna a poluentes; (b) da eficácia dos sistemas de reparo do DNA das células paternas; e (c) da capacidade materna em reparar lesões do espermatozoide remanescente no zigoto (Marchetti et al. 2015). Nesse contexto, mutações herdadas, ou Instabilidade Genômica Transgeracional (TGI, do inglês *Transgenerational Genomic Instability*), podem acarretar danos à saúde, aumentando, por exemplo, a predisposição a doenças como o câncer (Barber et al. 2006).

Da mesma forma, a análise de aberrações cromossômicas numéricas em espermatócitos, que pode refletir tanto a capacidade mutagênica quanto aneugênica de um composto ao qual o indivíduo esteve exposto, é relevante para predizer se há maiores chances da F1 manifestar doenças relacionadas à aneuploidias (Marchetti et al. 2001). No que corresponde à ação de corantes sobre células germinativas de mamíferos, a literatura é escassa. Há apenas relatos sobre os efeitos de corantes à base de benzidina, que sinalizam para possível atividade tóxica desses compostos (Gray Jr et al. 1992; Gray & Ostby, 1993).

Diante do apresentado, fica evidente a importância e a necessidade de monitoramentos ambientais de rotina, a fim de identificar situações de risco para a saúde humana e à biota. Portanto, este estudo foi realizado buscando contribuir para a definição do potencial mutagênico de alguns corantes utilizados pela indústria têxtil e para ressaltar a relevância de avaliações de substâncias em baixas concentrações.

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

A exposição aguda ou crônica a corantes têxteis pode induzir alterações genéticas e aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial carcinogênico e toxicogenômico, respectivamente, de amostras de água sob a influência de atividades têxteis e dos azo corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291*, em roedores.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar:

- a formação de lesões pré-neoplásicas (focos criptas aberrantes) em cólon;
- os níveis de danos primários (quebras de cadeia e sítios álcali-lábeis) no DNA de células hepáticas e renais;
- a frequência de alterações citogenéticas (micronúcleos) em células de medula óssea;
- alterações no padrão transcricional dos genes *BAX*, *BCL2*, *SMAD4* e *TNFA* em células sanguíneas e hepáticas;
- expressão de genes relacionados à toxicidade e estresse celular em células de hepáticas;
- número, morfologia e integridade do DNA de espermatozoides e os danos primários (quebras de cadeia e sítios álcali-lábeis) no DNA de células germinativas testiculares (Anexo II).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas abordagens para avaliação do potencial toxicogenético e carcinogênico dos corantes: na primeira, foram avaliadas amostras de água sob a influência de efluentes da indústria têxtil; na segunda, o mecanismo de ação de dois dos corantes azoicos, *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291*, frequentemente encontrados nas amostras de água (Vacchi et al. 2016a; 2016b). Foram utilizados métodos específicos para cada abordagem.

5.1. Potencial carcinogênico de águas sob influência de atividades têxteis

5.1.1. Coleta das amostras

No dia 13 de fevereiro de 2014, sob condição de grave seca (CETESB, 2015c) foram coletadas amostras de água da foz do Ribeirão Quilombo (RQ) e do efluente tratado da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) – Carioba, ambos localizados em Americana, São Paulo – Brasil (Figura 3). As amostras foram coletadas com recipiente de aço inox e transferidas para frascos de vidros (previamente esterilizados), sem *headspace*. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao laboratório e processadas no mesmo dia. Para o teste de carcinogenicidade *in vivo*, as amostras foram distribuídas em alíquotas de 1, 10 e 100 mL e 500 mL para análises físico-químicas. Todas foram preservadas a -20 °C até o momento dos ensaios.

5.1.2 Análises físico-químicas

A presença de metais pesados, como chumbo, cobre e cádmio nas amostras de água, foi avaliada por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama. Além disso, foram quantificados os níveis de carbono (inorgânico, orgânico e total) e de

sólidos totais dissolvidos, o pH, a condutividade, cor e turbidez. Todos os ensaios analíticos foram conduzidos pela Dra. Bianca Ferreira da Silva, no Laboratório coordenado pela Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni (Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP).

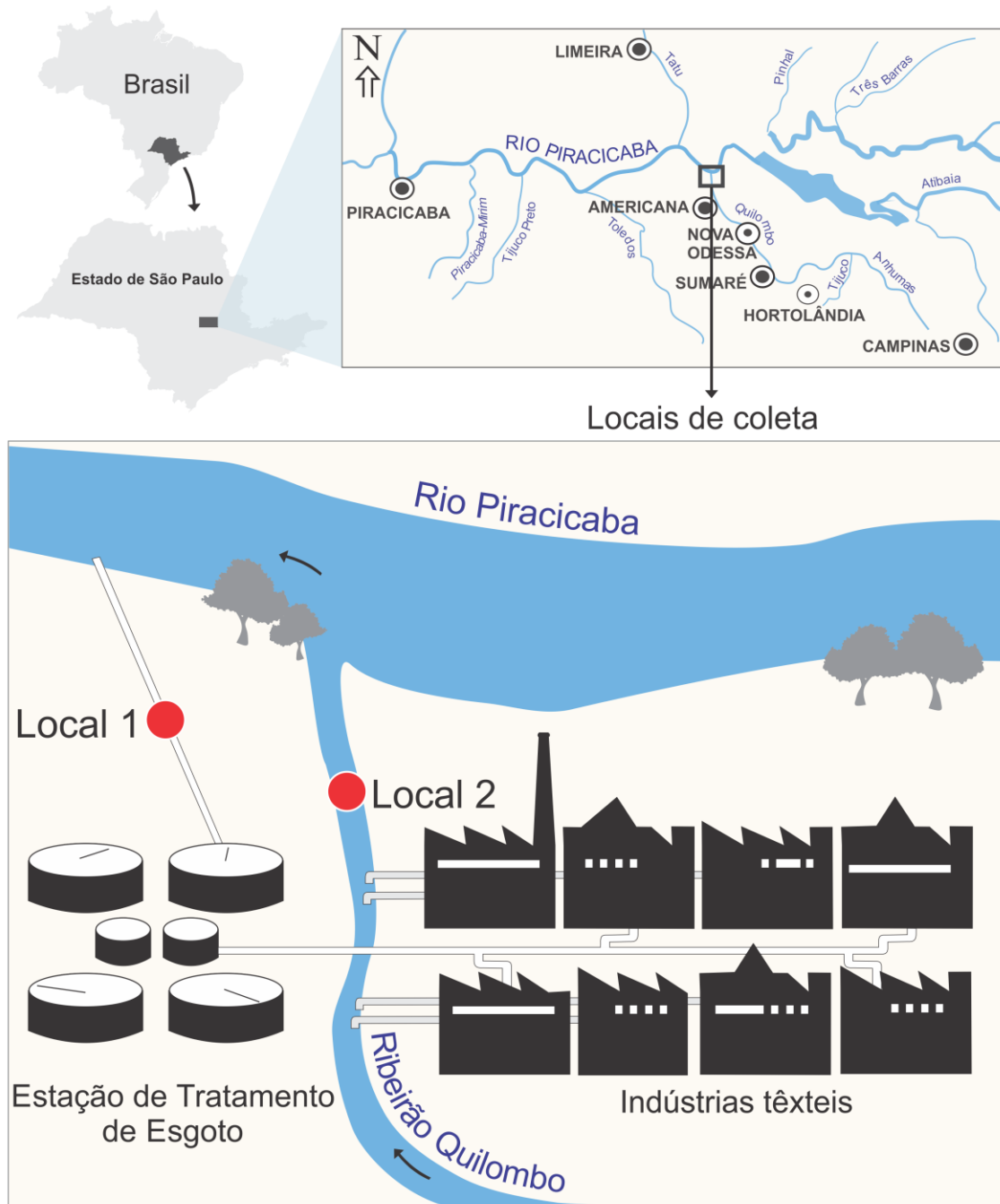


Figura 3: Mapas e diagrama indicando os locais de coleta das amostras sob a influência de efluentes de indústria têxtil: local 1, efluente tratado da Estação de Tratamento de Esgoto – Carioba; local 2, Ribeirão Quilombo em Americana, São Paulo, Brasil.

5.1.3 Animais

Para o teste de carcinogenicidade *in vivo* foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos da linhagem Wistar, de quatro semanas de idade, adquiridos do Biotério Animais de Laboratório – ANILAB (Paulínia-SP). Os animais, com sanidade atestada, foram aclimatados no biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (FMB – UNESP), por período de duas semanas antes do início dos experimentos, sob condições controladas de temperatura (22-24 °C), ciclo de luz (12 horas claro-escuro) e recebendo água filtrada e ração sem restrição. A Comissão de Ética para Experimentação Animal da FMB - UNESP aprovou os protocolos utilizados neste estudo (1002/2013 e 35/2014 – Anexo III).

5.1.4 Delineamento experimental

Dois protocolos de tratamento foram utilizados: (i) com as amostras de água do Ribeirão Quilombo; (ii) com amostras do efluente tratado da ETE (Figura 4). Para cada um dos protocolos foram utilizados 60 animais, distribuídos em cinco grupos (n=12/cada): Grupo 1 - controle negativo, os animais recebendo apenas água filtrada, foram tratados com EDTA por meio de quatro injeções subcutâneas, sendo duas injeções por semana, nas duas primeiras semanas (dose total = 1,85 mg/kg p.c.); Grupo 2 - controle positivo, animais recebendo apenas água filtrada, foram tratados com a 1,2-dimetilhidrazina (DMH - solubilizado em solução de EDTA), duas injeções subcutâneas por semana, por duas semanas, numa dose total de 160 mg/kg p.c; Grupos 3, 4 e 5 - os animais foram tratados com água coletada do Ribeirão Quilombo, respectivamente nas concentrações de 0,1%, 1 % e 10 %, por via oral (água no bebedouro renovada a cada 24 horas), sem restrição, durante 15 dias.; Grupos 6, 7 e 8 – os animais receberam água do efluente tratado da ETE, respectivamente nas concentrações de 0,1%, 1% e 10 %, da mesma forma dos três últimos

grupos. Após o período de tratamento (2 semanas), os animais receberam água filtrada por mais quatro semanas até a eutanásia. Os consumos de água e ração e o peso corpóreo foram monitorados durante todo o período experimental (6 semanas) e a eutanásia realizada por meio de injeção intraperitoneal (ip.) de xilazina (20 mg/kg p.c.) e ketamina (180 mg/kg p.c.) para a coleta do cólon, fígado, rins e coração dos animais.

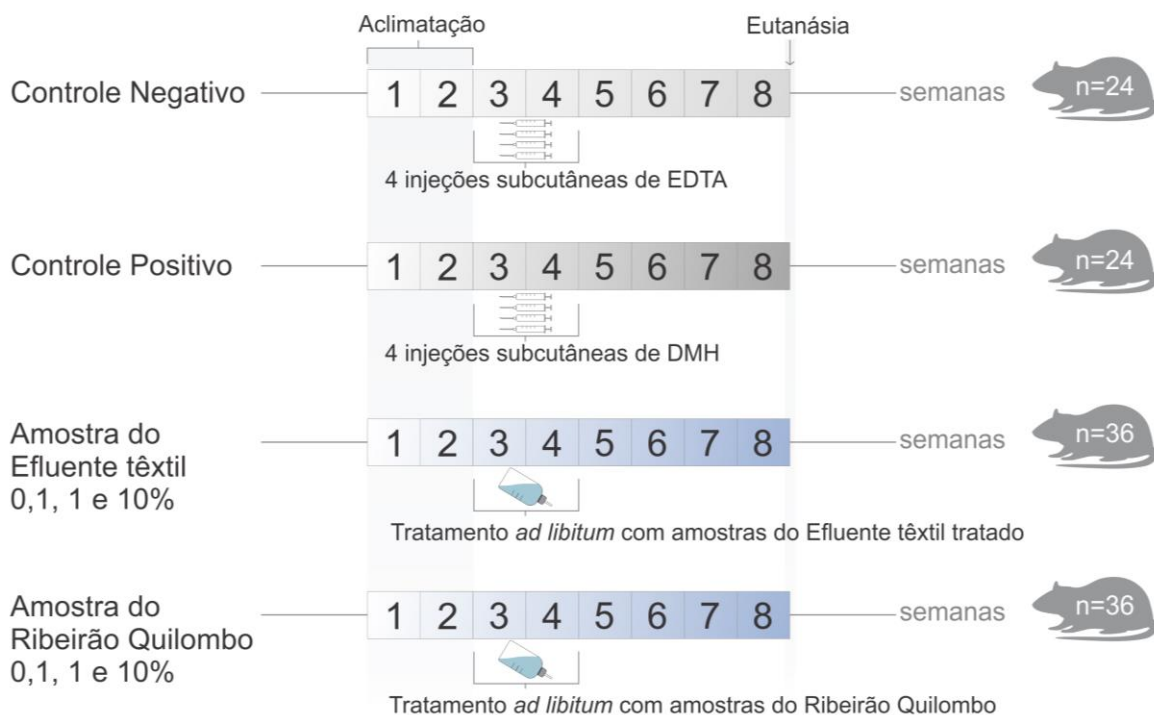


Figura 4: Delineamento experimental para o teste de criptas aberrantes em ratos Wistar. EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético (dose total de 1,85 mg/kg p.c.), por via subcutânea; DMH, 1,2-dimetilhidrazina (dose total de 160 mg/kg p.c.).

5.1.5 Teste de focos de criptas aberrantes (FCA)

Para o teste de FCA, o colón foi retirado, lavado em água corrente, estendido sobre uma placa de poliestireno e preso por alfinetes (Bird 1987). Em seguida, o cólon foi fixado em formaldeído tamponado 10% por 24h, posteriormente deixado em água por outras 24h e, finalmente, em etanol 70% até o momento da análise microscópica. Para a análise topográfica em microscopia óptica de luz (aumento de 100 x), o cólon foi corado com

solução de azul de metileno (0,2%) por 15 minutos e, em seguida, foram seccionadas duas regiões para análise: cólon médio e distal. De cada região foram analisados 100 campos para verificar a presença de focos de criptas aberrantes (FCA), de criptas aberrantes (CA), e a relação de CA/FCA.

5.1.6. Análise estatística

Os dados paramétricos foram analisados pelo teste ANOVA-*one way* seguido pelo teste de Tukey; os não-paramétricos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.2. Avaliação toxicogenética e toxicogenômica de corantes têxteis isolados

5.2.1 Corantes azoicos

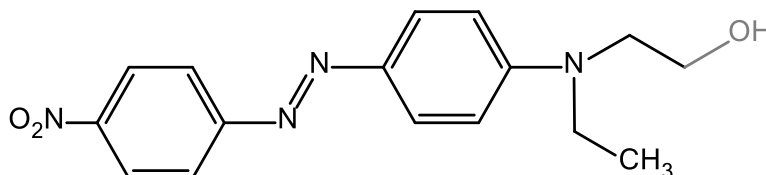
Os corantes *Disperse Red 1* (DR1) e *Disperse Blue 291* (DB291) selecionados para estudo possuem características físico-químicas distintas e que são apresentadas na Figura 5.

5.2.2 Animais

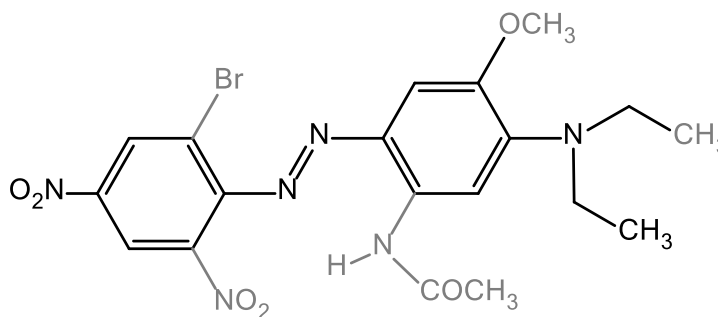
Para avaliação toxicogenética e toxicogenômica *in vivo* foram utilizados 128 camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss*, de quatro semanas de idade, adquiridos do Biotério ANILAB (Paulínia-SP). Os animais, com sanidade atestada, foram aclimatados no biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (FMB – UNESP), por período de duas semanas antes do início dos experimentos, sob condições controladas de temperatura (22-24 °C), ciclo de luz (12 horas claro-escuro) e recebendo água filtrada e ração sem restrição. A Comissão de Ética para Experimentação Animal da FMB – UNESP aprovou os protocolos utilizados neste estudo (1002/2013, 35/2014 e 30/2015 – Anexo III).

5.2.3 Delineamento experimental

As avaliações toxicogénicas e toxicogênicas dos corantes DR1 e DB291 foram realizadas em duas etapas (Figura 6): na primeira, foram utilizadas concentrações obtidas a partir de estudos piloto de toxicidade (dados não apresentados) e levou-se em conta o limite



Color Index	<i>Disperse Red 1</i>
CAS	2872-52-8
Pureza	95 %
Fórmula Molecular	$C_{16}H_{18}N_4O_3$
Peso Molecular	314,34
Lipofilia (LogP)	3,2
Nome IUPAC	<i>2-[N-ethyl-4-[(4-nitrophenyl)diazenyl]anilino]ethanol</i>
Origem	Sigma-Aldrich



Color Index	<i>Disperse Blue 291</i>
CAS	56548-64-2
Pureza	99,1 %
Fórmula Molecular	$C_{19}H_{21}BrN_6O_6$
Peso Molecular	509,31
Lipofilia (LogP)	4,8
Nome IUPAC	<i>N-[2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)diazenyl]-5(diethylamino)-4-methoxyphenyl]acetamide</i>
Origem	Purificado por Umbuzeiro et al. (<i>in preparation</i>)

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).

máximo de concentração (2.000 mg/kg) recomendado para estudos de toxicidade aguda pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD 2014); na segunda, as concentrações foram definidas com base nas máximas detectadas para ambos os corantes em águas superficiais dos rios Piracicaba (*Disperse Red 1*: 0,5 µg L⁻¹; Vacchi et al., 2016a) e Quilombo (*Disperse Blue 291*: 0,05 µg L⁻¹; Vacchi et al., 2016b). Foi utilizada a seguinte equação (ATSDR, 2005):

- para o *Disperse Red 1*

$$D = \frac{C \times TI \times FE}{PC} \quad D = \frac{(0,5 \mu\text{g} / \times 0,0035 \text{ L} / \text{dia} \times 1)}{0,03 \text{ kg}} = 0,05 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$$

Em que:

D = dose de exposição (µg/kg/dia)

C = concentração do contaminante (µg/L)

TI = taxa de ingestão de água contaminada (L/dia)

FE = fator de exposição/1 dia

PC = peso corpóreo (kg)

- para o *Disperse Blue 291*

$$D = \frac{C \times TI \times FE}{PC} \quad D = \frac{(0,05 \mu\text{g} / \times 0,0035 \text{ L} / \text{dia} \times 1)}{0,03 \text{ kg}} = 0,005 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$$

Portanto, para o corante DR1 foram definidas as concentrações de 0,5 e 5 µg/kg p.c, respectivamente, 10 e 100 vezes maiores que o valor detectado nas águas superficiais. Para assegurar a similaridade nas concentrações utilizadas dos dois corantes, as mesmas

foram utilizadas para o DB291. No entanto, estas corresponderam a, respectivamente, 100 e 1000 vezes os valores reais encontrados nos corpos fluviais.

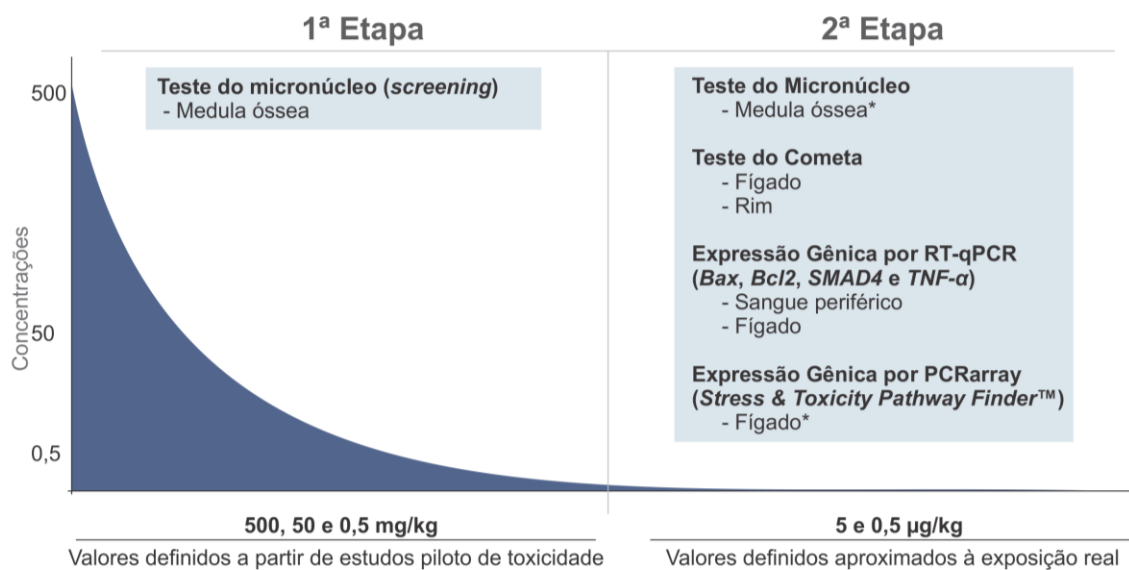
Para a primeira etapa, foram utilizados camundongos adultos distribuídos em nove grupos de 8 animais: Grupo 1 - controle negativo, recebeu apenas água e ração basal durante todo o período experimental; Grupo 2 - controle positivo, foi tratado com uma injeção ip. de *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU; 50 mg/kg p.c), 24 horas antes da eutanásia; Grupo 3, controle do veículo da diluição utilizado para solubilizar o corante lipofílico DB291 nas concentrações utilizadas, foi tratado com DMSO 100% (0,1 ml/10 g p.c.), por via gástrica (*gavage*); Grupos 4, 5 e 6 - os animais foram tratados com DR1, respectivamente com as concentrações de 0,5, 50 e 500 mg/kg p.c; Grupos 7, 8 e 9 tratados com o DB291, respectivamente nas concentrações de 0,5, 50 e 500 mg/kg p.c. A eutanásia dos animais foi realizada por injeção ip. de solução de xilazina (16 mg/kg) e ketamina (120 mg/kg).

Na segunda etapa, os camundongos foram distribuídos em 8 grupos com 8 animais, sendo: Grupos 1 e 2 – iguais aos da primeira etapa; Grupo 3 - controle do veículo da diluição, tratado DMSO 0,5 % (0,1 mL/ 10 g p.c.), por via gástrica (*gavage*); Grupos 4 e 5 - foram tratados com DR1, respectivamente com as concentrações de 0,5 e 5 µg/kg p.c; Grupos 6 e 7 – tratados com o DB291 com as respectivas concentrações de 0,5 e 5 mg/kg p.c. Nesta etapa, a eutanásia foi realizada por deslocamento cervical, 24 h após o tratamento dos animais. Foram coletos o fígado, rins, fêmures e amostras do sangue periférico.

5.2.4 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos foi conduzido de acordo com a técnica descrita por Ribeiro (2003). Todos os passos estão detalhados a seguir.

Estratégias metodológicas utilizadas para avaliação toxicogenética e toxicogenômica dos corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291*



Grupos experimentais

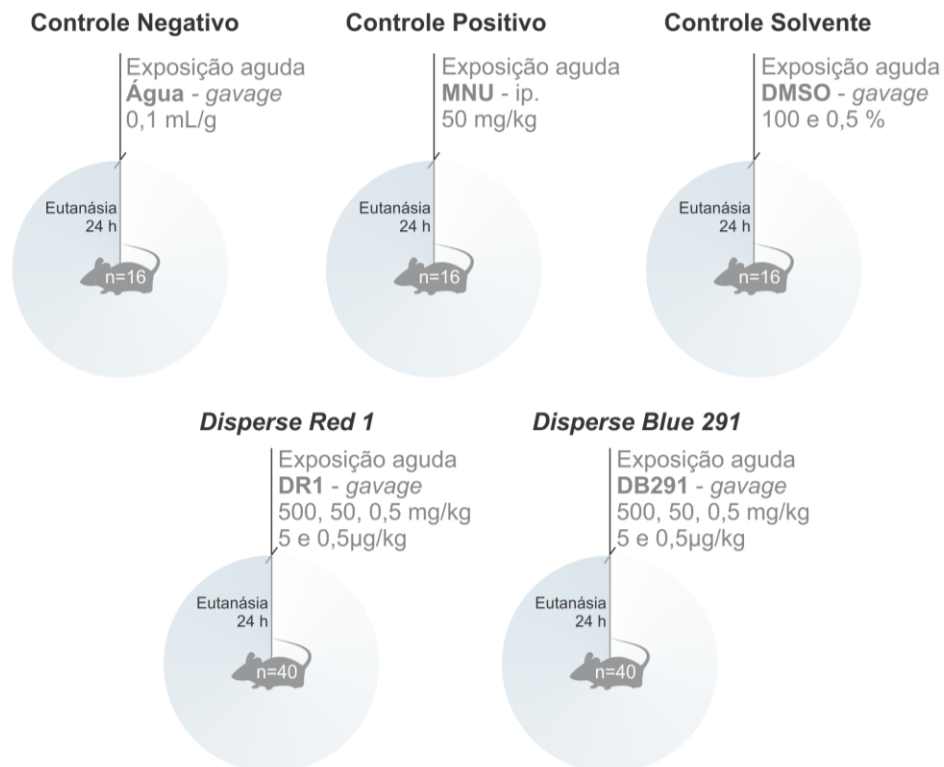


Figura 6: Esquema do delineamento experimental utilizado para avaliação dos corantes têxteis *Disperse Red 1* (DR1) e *Disperse Blue 291* (DB291). * Ensaios realizados apenas para o corante DR1.

Confeção e análise das lâminas: 24 h após a exposição aguda aos corantes DR1 e DB291, ambos os fêmures foram coletados e limpos para remoção de fibras musculares. A região proximal da cabeça femoral foi seccionada e, em seguida, os ossos foram colocados em tubos de centrifuga, contendo 2,5 mL de soro fetal bovino. Com auxílio de seringa e agulha fina, a medula óssea foi removida pela técnica de *flushing*.

Na sequência, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm, parte do sobrenadante (2 mL) foi removida e o sedimento suspenso para realização do esfregaço celular. As lâminas, em duplicada, foram secas à temperatura ambiente, o material fixado em metanol absoluto por 5 min e a coloração feita utilizando-se o corante Giemsa puro, por 3 min. A análise da frequência de eritrócitos policromáticos (PCE, do inglês *polychromatic erythrocytes*) micronucleados foi realizada em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x, imersão), sendo contados 1000 PCEs por animal. Para avaliação de efeito citotóxico, foi analisada a relação PCE/NCE (do inglês *normochromatic erythrocytes*) em 400 eritrócitos (PCE + NCE) por animal. A obtenção dos índices de divisão nuclear (IDN) seguiu metodologia sugerida por Krishna & Hayashi (2000): $IDN = PCE / (PCE + NCE)$

5.2.5 Teste do cometa

Para avaliação de danos primários no DNA (quebras de cadeia simples e dupla e sítios álcali-lábeis) foi utilizado o teste do cometa, conforme metodologia sugerida por Gontijo & Tice (2003), com modificações propostas por Burlinson (2012). Resumidamente, as suspensões celulares obtidas a partir de fragmentos de fígado e rim (aproximadamente 0,5 cm³) foram colocadas em solução de PBS 1X (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free, heptahidratado) contendo EDTA (20 mM) e 10% de DMSO, a 4°C, para atenuar possíveis danos oxidativos induzidos pelo ferro presente no sangue, por espécies reativas de oxigênio e pela ação de endonucleases. Posteriormente, 30 µL da suspensão celular de

cada órgão foram homogeneizados com 140 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% para confecção das lâminas (duplicata) previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Após a polimerização da agarose (5 minutos em geladeira), as lâminas foram submersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton-X 100 1%; pH 10), a 4°C e, após 24 h, as lâminas foram lavadas com PBS 1X por 5 min, transferidas para cuba de eletroforese e submersas em solução alcalina de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM; pH >13), a 4°C por 20 min para promover o desenovelamento do DNA. Ao fim desse período, o material biológico nas lâminas foi submetido à eletroforese com corrente elétrica de 25 volts (1,0 V/cm, 300 mA), por 20 min. Terminada a eletroforese, o pH foi neutralizado com solução de Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5), por 15 min, as lâminas deixadas para secar em temperatura ambiente e posteriormente fixadas em etanol absoluto por 10 min. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 75 µL de solução aquosa do corante intercalante SYBR® Gold (1:9999). Foram analisados 100 nucleoides por animal, em aumento de 400x, em microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagens (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments*, Inglaterra). O parâmetro utilizado como indicativo de dano no DNA foi a porcentagem de DNA na cauda do cometa (*tail intensity*).

5.2.6 Análise de expressão gênica

5.2.6.1 Extração e quantificação de RNA

Amostra de sangue total da veia facial dos camundongos, coletada 24h após o tratamento com a substância-teste, foi preservada em *RNAprotect Animal Blood Tubes* (Qiagen) e armazenada em *freezer* -20°C. Para purificação do RNA total foi utilizado *kit* de extração (*RNeasy Protect Animal Blood kit*; Qiagen) específico para células sanguíneas. Paralelamente à coleta do sangue, fragmento central do lóbulo direito do fígado foi

imediatamente transferido para um criotubo, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o momento da extração do RNA com o *RNeasy Mini kit* (Qiagen), segundo recomendações do fabricante. Ambos os protocolos de extração consistem na lise da membrana celular, tratamento enzimático (proteínase e/ou DNase) em coluna de sílica (*RNeasy MinElute Spin Columns* – Qiagen), seguido da eluição do RNA total. O RNA foi imediatamente analisado em espectrofotômetro (*NanoDrop™ OneC Spectrophotometer* - Thermo Fisher Scientific) para verificação da concentração e pureza a partir das razões de 280/260nm e 280/230nm, as quais são indicativas de contaminação por proteínas e compostos fenólicos, respectivamente. A amostra de RNA foi considerada pura quando as razões estavam entre 1,8 – 2,2. Em seguida, as amostras foram armazenadas em *freezer* a -80 °C, até o momento da síntese de cDNA.

5.2.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT) para os genes *BAX*, *BCL2*, *TNFA* e *SMAD4*

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total utilizando-se o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Thermo Fisher Scientific). Para cada amostra foram adicionados 30 µL do mix (RT *Buffer* 10X, RT *Random Primers*, dNTP *Mix*, MultiScribe® *Reverse Transcriptase* e H₂O), 1 µg de RNA e 60 µL de água RNase/DNase *free* q.s.p.. As reações foram realizadas em termociclador configurado com o seguinte programa: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 4°C infinito. Em seguida, as etapas de PCR foram realizadas em termociclador automático (ABI Prism 7500 *FAST SequenceDetection System*, AppliedBiosystems). Para a amplificação, foi utilizado o sistema *TaqMan®* (AppliedBiosystems), o qual é composto por um mix universal de

reagentes (*TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix*) e uma sonda para cada gene marcada com o fluorocromo FAM-MGB específica para camundongo (Tabela I).

A análise dos dados foi feita na plataforma *Thermo Fisher Connect qPCR analysis apps* (*Thermo Fisher Cloud 2.0* - www.apps.thermofisher.com/apps/dashboard), pelo método do *Threshold cycle* (Ct) Comparativo ($\Delta\Delta\text{CT}$), utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, Tabela I. Nomenclatura e informações complementares das sondas utilizadas para a avaliação toxicogenômica dos corantes têxteis *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291*

Gene	Entrez Gene ID	Assay ID (ThermoFisher)	Localização cromossomal
<i>BAX</i>	12028	Mm00432051_m1	Cr.7: 45461695 - 45466903
<i>BCL2</i>	12043	Mm00477631_m1	Cr.1: 106538178 - 106714290
<i>SMAD4</i>	17128	Mm03023996_m1	Cr.18: 73638998 - 73703741
<i>TNFA</i>	21926	Mm00443258_m1	Cr.17: 35199367 - 35202007

em que: $\Delta\Delta\text{Ct}$ = média do ΔCT (gene alvo:) - média do ΔCt (genes de referência: *GAPDH*, sangue; e *ACTB*, fígado). Genes com valores de *Fold change* $\geq 1,99$, e com valor de $p < 0,05$, foram considerados *upregulated*.

5.2.6.3. Análise da expressão gênica por qPCR-RT array

Para o estudo de genes relacionados à toxicidade e ao estresse celular foram utilizadas placas de PCR *array* com 84 genes-alvos, específicas para essas vias (PAMM-003Z, Qiagen – SABiosciences®). Os genes, de acordo com o grupo funcional, estão listados na Tabela II e apresentados, detalhadamente, no Anexo IV.

Os demais genes presentes na placa serviram como controle da técnica. Foram eles: 5 genes de controle endógeno/*housekeepings* (*B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH* e *ACTB*), 1 de controle de contaminação por DNA genômico, 3 controles de eficácia da transcrição reversa e outros três que asseguravam a eficiência da PCR. Valores de expressão gênica

com *fold change* $\geq 1,99$ e valor de $p \leq 0,05$ foram considerados *upregulated*. Anteriormente à síntese de cDNA, foi realizada a eliminação de possíveis fragmentos de DNA genômico pela adição de *buffer GE* (Qiagen) RNase/DNase free nas amostras de RNA. Este *mix* foi incubado por 5 min a 42 °C e imediatamente colocado sobre o gelo por,

Tabela II. Lista de genes distribuídos em grupos funcionais

Grupos funcionais	Genes
Estresse oxidativo e metabólico	<i>FTH1, GCLC, GCLM, GSR, GSTP1, HMOX1, NQO1, PRDX1, SQSTM1, TXN1 e TXNRD1.</i>
Hipóxia	<i>ADM, ARNT, BNIP3L, CAR9, EPO, HMOX1, LDHA, MMP9, SERPINE1, SLC2A1 e VEGFA.</i>
Morte celular	
<i>Autofagia</i>	<i>ATG5, ATG7, ATG12, BECN1 e ULK1.</i>
<i>Apoptose</i>	<i>CASP1, FAS, MCL1, RIPK1, TNFRSF10B e TNFRSF1A.</i>
<i>Necrose</i>	<i>FAS, GRB2, PARP1, PVR, RIPK1, RIPK3, TNFRSF10B, TNFRSF1A e TXNL4B.</i>
Resposta inflamatória	<i>CCL12, CD40LG, CRP, IFNG, IL1A, IL1B, IL6, TLR4 e TNF.</i>
Genes de resposta a danos no DNA	
<i>Pontos de verificação (Checkpoint) e bloqueio do ciclo celular</i>	<i>CDKN1A, CHEK1, CHEK2, DDIT3, HUS1, MRE11A, NBN, RAD17, RAD9A, ATM, ATR, DDB2, GADD45A, GADD45G, RAD51, TRP53 e XPC.</i>
<i>Choque térmico (heat shock) e resposta à desnaturação de proteína</i>	<i>ATF4, ATF6, ATF6B, BID, CALR, DDIT3, DNAJC3, HSP90AA1, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 e XBP1.</i>

no mínimo, 1 min. Após esse passo, o *mix* de transcrição reversa, contendo *buffer BC3*, controle P2, transcriptase reversa RE3 e água livre de RNase, foi adicionado ao *mix* de

eliminação genômica de DNA. A reação foi incubada a 95 °C por 5 min. A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o *kit RT² First Strand* (AppliedBiosystems). Na sequência, uma alíquota de cDNA foi adicionada ao *mastermix* (RT² SYBR® *Green* qPCR *Mastermix*, SABiosciences, Qiagen) com água livre de RNase e DNase. Posteriormente, 25 µl desse *mix* de cDNA/*mastermix* foram adicionados em cada poço da placa de PCR *array*.

Para análise dos dados foi utilizado o valor de *fold change* (plataforma *Data Analysis Center V4*, QIAGEN – www.qiagen.com/ch/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page). Neste caso, o valor de p foi calculado pelo teste t *Student*, com valores em triplicatas para cada gene no controle e grupo tratado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.2.7 Avaliação da toxicidade reprodutiva do corante *Disperse Red 1*

A metodologia utilizada nesta etapa encontra-se disponíveis no link www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089062381500057X.

6. RESULTADOS

6.1. Amostras de água sob influência de corantes têxteis

6.1.1. Análises físico-químicas das amostras de água

A Tabela III apresenta os parâmetros físico-químicos avaliados a partir das amostras de água coletadas do Ribeirão Quilombo e do efluente tratado da ETE – Carioba. Os dados mostraram que a cor (PCU) e a condutividade da água do Ribeirão do Quilombo estavam, respectivamente, 6 e 10 vezes acima dos valores de referência definidos pela legislação brasileira vigente (CETESB, 2009; CONAMA, 2011). Dentre os metais pesados avaliados, foi detectado apenas o cobre (limite de detecção 0,01 mg/L).

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

	Ribeirão Quilombo	Referência ¹	Efluente tratado	Referência ²
<i>Parâmetros químicos</i>				
Carbono inorgânico (mg/L)	47,5	n.c.	51,5	n.c.
Carbono orgânico total (mg/L)	44,5	n.c.	53,5	n.c.
Carbono Total (mg/L)	92	n.c.	105	n.c.
Cobre dissolvido (mg/L)	0,01	Até 0,013	0,01	Até 1
Condutividade (µS/cm)	1.059*	³ Até 100	1.218	n.c.
Cor (PCU)	480*	75	442	n.c.
Turbidez (UNT)	91,6	Até 100	64,2	n.c.
pH	7,64	6 a 9	7,68	5 a 9
Sólidos totais dissolvidos (mg/L)	477	Até 500	608	n.c.

¹ Resolução CONAMA nº357 (para águas doces de classe 3; CONAMA – Ministério do Meio Ambiente – MMA (2005); ²Resolução CONAMA nº430 (para efluentes; (CONAMA, 2011); ³ valor recomendado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2009). n.c – não consta; * fora do padrão recomendado.

6.1.2. Parâmetros biométricos

Os dados mostraram maior ingestão de água pelos animais que receberam a amostra mais concentrada (10%) do Ribeirão Quilombo. Não foram observadas diferenças significativas de consumo de ração, ganho de peso corpóreo e de pesos relativos dos rins, fígado e do coração entre todos os grupos (Tabela IV).

6.1.3. Histopatologia de fígado

As análises histopatológicas mostraram alteração da homeostase hepática, com aumento de esteatose (acúmulo de gordura) macro ou microvesicular e glicogenose (acúmulo de glicogênio) (Figura 7).

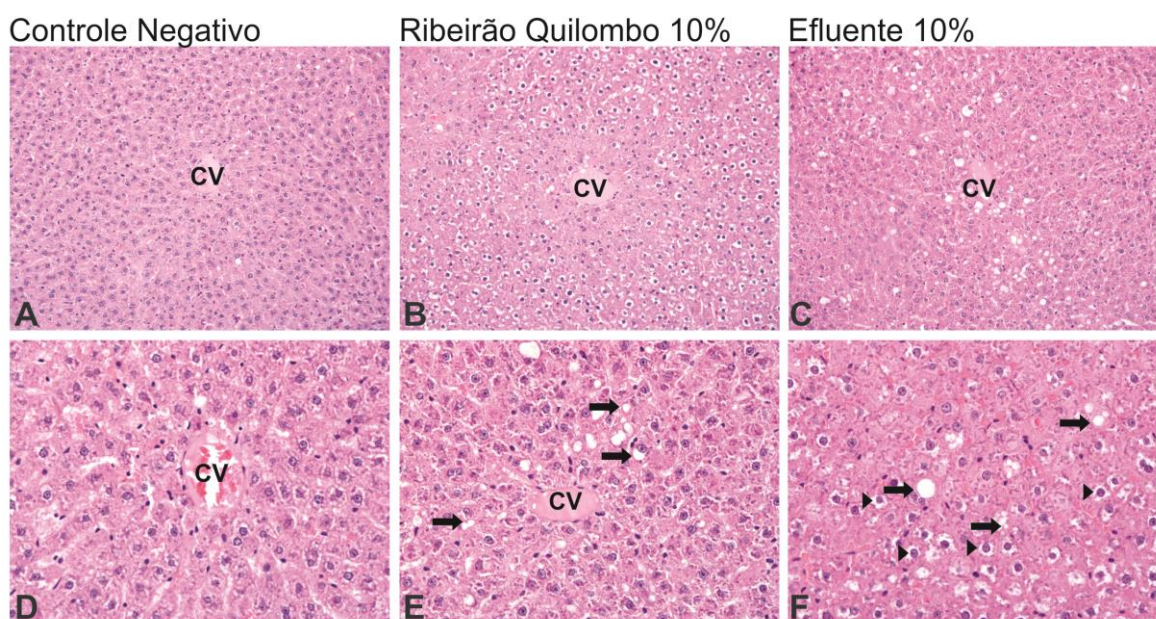


Figura 7: Fotomicrografias de fígado de ratos. A e D – controle negativo; B e E animais tratados com amostras de água do Ribeirão Quilombo; C e F animais tratados com água do efluente da Estação de Tratamento de Esgoto. As setas indicam micro e macrovacuolização; as cabeças de seta indicam células com 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.

6.1.4. Focos de criptas aberrantes no cólon

A Tabela V mostra que não houve aumento de criptas aberrantes nos animais tratados com ambas as amostras de água nas concentrações avaliadas (0,1, 1 e 10%) em relação ao controle negativo.

6.2. Corantes isolados: *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291*

6.2.1 Análise macroscópica

Durante a necropsia foi observada pigmentação avermelhada no peritônio e órgãos dos camundongos tratados com o *Disperse Red 1* (500 mg/kg p.c.), evidenciando a ampla dispersão desse composto após administração oral. Diferentemente, nos animais tratados com a maior concentração com o *Disperse Blue 291* (500 mg/kg p.c.) foi observada presença localizada do corante na porção proximal do cólon (Figura 8).

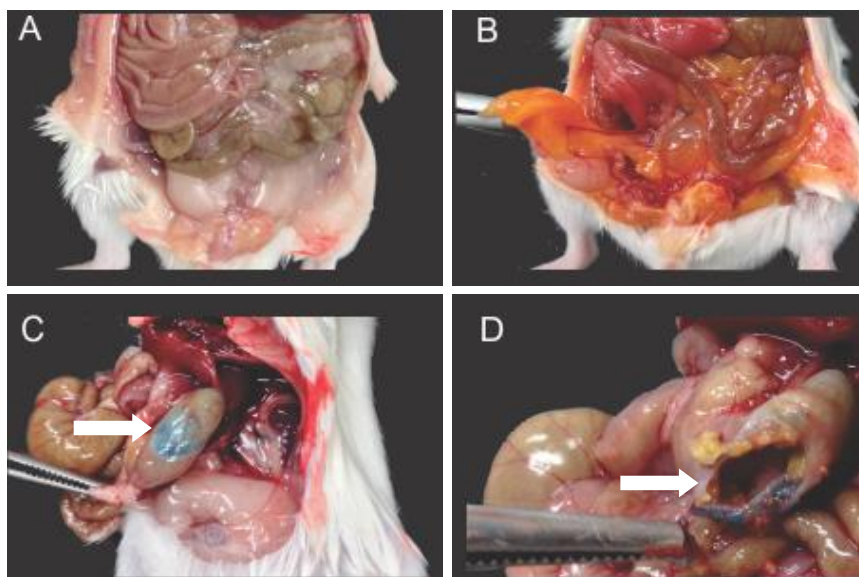


Figura 8: Fotografias do sistema digestivo de camundongos do grupo controle negativo (A) e daqueles tratados com os corantes (B) *Disperse Red 1* (500 mg/kg) e (C e D) *Disperse Blue 291* (500 mg/kg). As setas indicam porção proximal do cólon com acúmulo do corante *Disperse Blue 291*.

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%)

	Controle Negativo	DMH	0,1%	1 %	10 %
Ribeirão Quilombo					
Consumo de água (mL/animal/dia)	35,8 ± 2,8	35,0 ± 7,4	36,2 ± 2,9	36,5 ± 3,0	41,4 ± 3,0**
Consumo de ração (g/animal/dia)	22,2 ± 3,8	24,1 ± 0,5	24,2 ± 1,3	22,0 ± 2,2	20,0 ± 2,1
Peso inicial (g)	309,9 ± 15,8	291,5 ± 10,8	304,4 ± 17,2	303,2 ± 31,2	309,1 ± 17,6
Peso final (g)	399,0 ± 33,5	350,9 ± 23,3	393,1 ± 36,4	378,2 ± 49,3	372,9 ± 27,2
Ganho de peso absoluto (g)	89,0 ± 30,5	59,4 ± 16,4	88,7 ± 24,1	75,0 ± 21,5	63,7 ± 21,0
Peso relativo do coração (%)	0,31 ± 0,11	0,31 ± 0,10	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,27 ± 0,02
Peso relativo do fígado (%)	4,00 ± 0,65	4,13 ± 0,34	4,68 ± 0,75	4,53 ± 0,83	4,00 ± 0,51
Peso relativo dos rins ¹ (%)	0,74 ± 0,09	0,76 ± 0,15	0,81 ± 0,09	0,75 ± 0,15	0,78 ± 0,14
Efluente					
Consumo de água (mL/animal/dia)	36,8 ± 3,8	32,3 ± 5,6	39,8 ± 7,1	35,8 ± 4,1	39,8 ± 4,5
Consumo de ração (g/animal/dia)	26,7 ± 5,7	20,3 ± 7,3	28,1 ± 6,2	27,5 ± 5,9	28,7 ± 6,3
Peso inicial (g)	237,3 ± 15,6	249,0 ± 25,5	264,9 ± 28,4	250,9 ± 18,9	246,6 ± 13,7
Peso final (g)	365,4 ± 28,1	343,8 ± 34,5	372,1 ± 32,2	352,0 ± 19,8	352,9 ± 24,5
Ganho de peso absoluto (g)	128,0 ± 23,2	94,8 ± 23,9	107,2 ± 17,9	101,1 ± 29,1	106,2 ± 27,9
Peso relativo do coração (%)	0,30 ± 0,06	0,32 ± 0,09	0,29 ± 0,07	0,31 ± 0,07	0,31 ± 0,09
Peso relativo do fígado (%)	3,91 ± 0,52	4,11 ± 0,52	4,58 ± 0,70	4,43 ± 1,03	4,70 ± 0,65
Peso relativo dos rins ¹ (%)	0,80 ± 0,13	0,85 ± 0,13	0,86 ± 0,11	0,78 ± 0,18	0,85 ± 0,20

¹Soma dos dois rins; Controle Negativo – EDTA; DMH - 1,2-dimetilhidrazina (160 mg/kg/p.c.; controle positivo); ** p < 0,01 com relação ao controle negativo.

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

Tratamentos	Cólon	Número de criptas aberrantes com								Número de FCA	Número de CA	Relação CA/FCA
		1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 criptas	5 criptas	6 criptas	7 criptas	8 criptas			
Controle	Distal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo ¹	Médio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle	Distal	8,1 \pm 16,8	10,8 \pm 6,8	12,0 \pm 8,7	7,0 \pm 4,1	5,0 \pm 5,9	2,4 \pm 3,9	0,5 \pm 0,8	0,1 \pm 0,4	45,9 \pm 37,5**	137,4 \pm 100,8**	3,1 \pm 0,8**
Positivo ²	Médio	2,3 \pm 3,3	10,8 \pm 6,8	12,0 \pm 8,7	7,0 \pm 4,1	5,0 \pm 5,9	2,4 \pm 3,9	0,5 \pm 0,8	0,1 \pm 0,4	40,0 \pm 25,2**	131,5 \pm 90,1**	3,3 \pm 0,5**
Ribeirão Quilombo												
0,1%	Distal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Médio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 %	Distal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Médio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 %	Distal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Médio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Efluente												
0,1 %	Distal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Médio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 %	Distal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Médio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 %	Distal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Médio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹EDTA; ²DMH: 1,2-dimetilhidrazina (160 mg/kg); CA: cripta aberrante. **p < 0,01 em relação ao controle negativo.

6.2.2. Mutagenicidade em células de medula óssea

Foi observado aumento da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos expostos aos corantes DR1 e DB291, respectivamente nas concentrações de 0,5 e 50 mg/kg p.c. e 50 mg/kg p.c. Ambos os corantes apresentaram citotoxicidade (diminuição da relação PCE/NCE) na maior concentração avaliada (500 mg/kg p.c.) (Tabela VI). Não foi observada atividade mutagênica do DR1 em concentrações próximas (0,5 e 5 µg/kg p.c.) às encontradas no ambiente fluvial (Tabela VII).

Tabela VI. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos (8 animais/grupo) tratados com *Disperse Blue 291* ou *Disperse Red 1*

Tratamentos	Nº PCEs	PCEMNs		Relação PCE/NCE ¹
		Nº	%	
Controle Negativo ²	8000	11	0,13	1,75 ± 0,17
Controle Positivo ³	8000	236	2,95*	1,76 ± 0,21
Veículo de diluição	8000	13	0,16	1,80 ± 0,11
<i>Disperse Red 1</i>				
0,5 mg/kg	8000	23	0,28 [#]	1,63 ± 0,12
50 mg/kg	8000	27	0,33 [#]	1,77 ± 0,24
500 mg/kg	8000	20	0,25	1,51 ± 0,18 [#]
<i>Disperse Blue 291</i>				
0,5 mg/kg	8000	21	0,26	1,61 ± 0,17
50 mg/kg	8000	31	0,38*	1,57 ± 0,16
500 mg/kg	8000	16	0,20	1,50 ± 0,12*

¹ Média ± desvio padrão; ² água filtrada; ³ *N*-metil-*N*-nitrosourea (50 mg/kg p.c.); veículo de diluição do DB291, dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. **p* < 0,05 em relação ao grupo controle negativo; [#] *p* < 0,05 em relação ao grupo veículo da diluição.

Tabela VII. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos (8 animais/grupo) tratados com o *Disperse Red 1*

Tratamentos	Nº PCEs	PCEMNs		Relação PCE/NCE ¹
		No	%	
Controle Negativo ²	8000	23	0,28	1,74 ± 0,11
Controle Positivo ³	8000	191	2,38*	1,88 ± 0,13
DR1 0,5 µg/kg	8000	22	0,27	1,65 ± 0,10
DR1 5 µg/kg	8000	25	0,31	1,76 ± 0,11

¹ Média ± desvio padrão; ² água filtrada; ³ *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU, 50 mg/kg p.c.).

DR1: *Disperse Red 1*.

6.2.3. Genotoxicidade em células renais e hepáticas

Foi observado pelo teste do cometa, aumento significativo ($p < 0,05$) de danos primários no DNA apenas em células hepáticas após o tratamento dos animais com o corante *Disperse Red 1* na concentração de 5 µg/kg. Nenhuma alteração foi detectada como resultado de tratamentos com o DB291 (Figura 9).

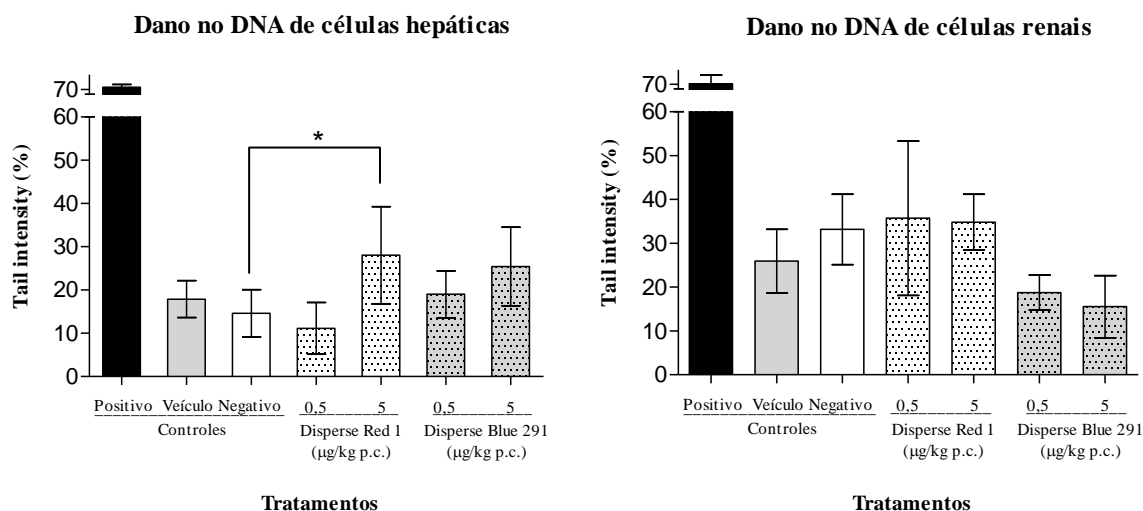


Figura 9: Danos no DNA (% *tail intensity*) de células hepáticas e renais de camundongos tratados com os corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* nas concentrações de 0,5 e 5 µg/kg de peso corpóreo. Controle positivo - MNU (50 mg/kg p.c.); controle veículo - DMSO à 0,5%; controle negativo (CN) – água filtrada. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CN.

6.2.4. Expressão gênica em células hepáticas e sanguíneas

A análise de expressão gênica mostrou que o *Disperse Red 1*, nas concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c., promoveu aumento dos níveis de mRNA apenas dos genes *BAX* e *BCL2* em células sanguíneas, 24 h após os tratamentos. Nos animais tratados com o corante *Disperse Blue 291*, não foi observada nenhuma alteração significativa de expressão gênica em ambos os tipos celulares (Figura 11).

Os dados da análise da expressão dos 84 genes relacionados à toxicidade e ao estresse celular em células do fígado de camundongos estão apresentados na Tabela VIII. Foi detectado aumento na expressão do transcrito *IL1B* (*interleukin-1 beta*) após o tratamento com o DR1 nas concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. (Figura 10). Por outro lado, o gene *CDKN1A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A - P21*) estava diferencialmente expresso apenas após o tratamento com a menor concentração (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.) do DR1 (Figura 10).

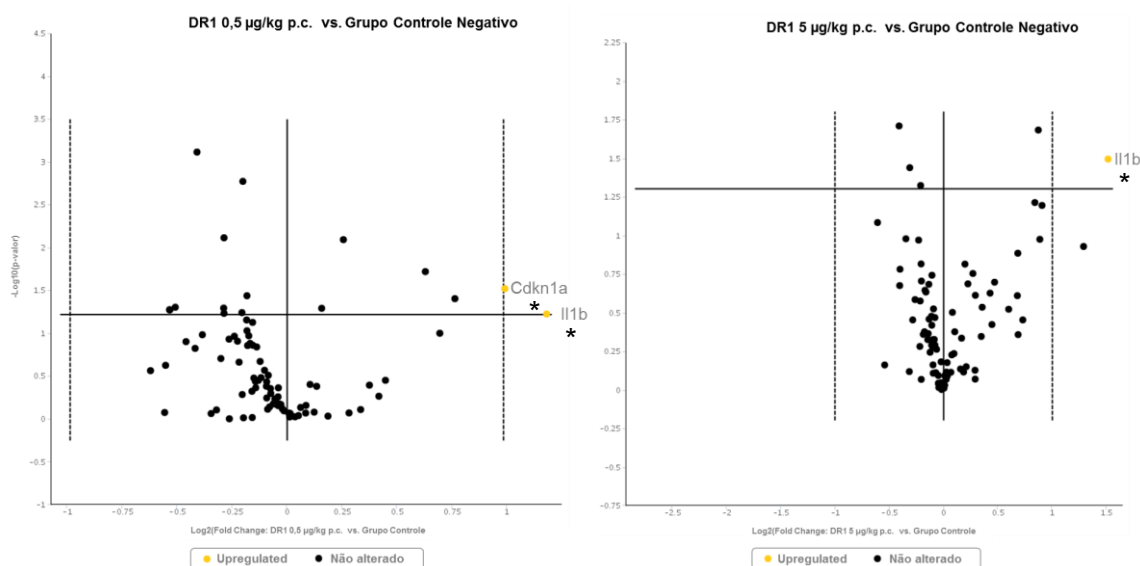


Figura 10: Distribuição dos valores de expressão gênica (*volcano plot*) em hepatócitos de camundongos após a exposição *in vivo* ao corante *Disperse Red 1* (DR1; 0,5 e 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.). Foram considerados com aumento de expressão os genes que apresentaram *fold change* $\geq 1,99$ e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

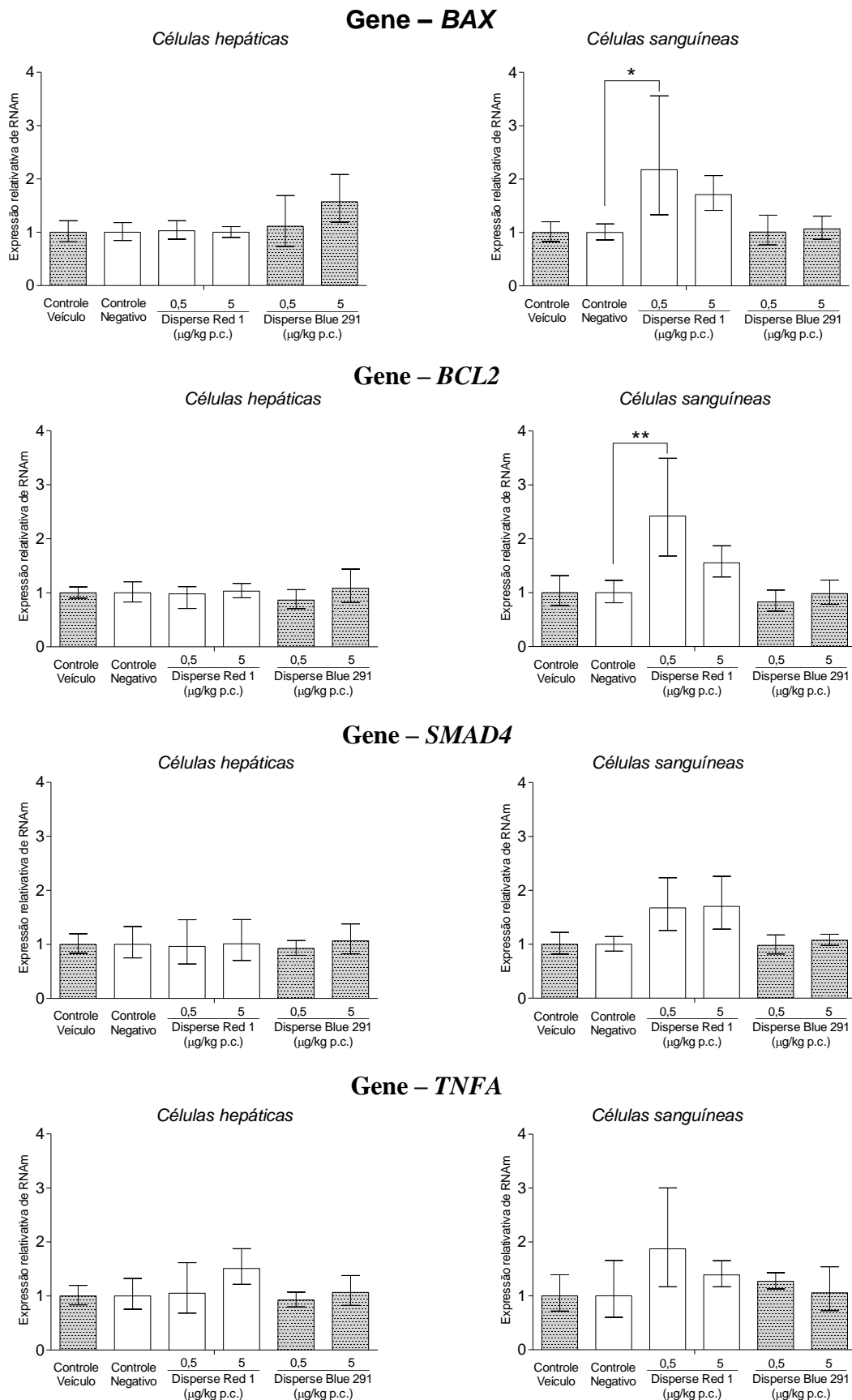


Figura 11: Expressão relativa dos genes *BAX*, *BCL2*, *SMAD4* e *TNFA* em células hepáticas e renais de camundongos 24 h após tratamento com os corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* (0,5 e 5 µg/kg de peso corpóreo – p.c.). Controle veículo, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%; controle negativo,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

Tabela VIII. Genes avaliados em células hepáticas (7 animais/grupo) após exposição *in vivo* ao corante *Disperse Red 1*

(Continua)

<i>Disperse Red 1</i>			<i>Disperse Red 1</i>		
0,5 µg/kg			5 µg/kg		
Símbolo oficial do gene	<i>Fold change</i>	Valor-p	Símbolo oficial do gene	<i>Fold change</i>	Valor-p
<i>IL1B</i>	2,27	0,05	<i>IL1B</i>	2,86	0,03
<i>CDKN1A</i>	1,99	0,03	<i>SERPINE1</i>	2,44	0,12
<i>AQP1</i>	1,7	0,04	<i>IL6</i>	1,87	0,06
<i>ADM</i>	1,62	0,10	<i>RIPK3</i>	1,85	0,11
<i>IL1A</i>	1,55	0,02	<i>IL1A</i>	1,83	0,02
<i>SERPINE1</i>	1,36	0,35	<i>MMP9</i>	1,79	0,06
<i>RIPK3</i>	1,34	0,54	<i>GSTP1</i>	1,66	0,35
<i>CHEK2</i>	1,3	0,40	<i>ADM</i>	1,61	0,13
<i>GADD45G</i>	1,26	0,78	<i>GADD45G</i>	1,61	0,44
<i>CHEK1</i>	1,22	0,85	<i>IFNG</i>	1,6	0,25
<i>RAD51</i>	1,14	0,93	<i>CDKN1A</i>	1,51	0,30
<i>SLC5A3</i>	1,1	0,42	<i>CFTR</i>	1,38	0,20
<i>TNFRSF10B</i>	1,09	0,84	<i>CCL12</i>	1,36	0,38
<i>SLC2A1</i>	1,07	0,40	<i>SLC9A3</i>	1,35	0,24
<i>MMP9</i>	1,06	0,70	<i>AQP2</i>	1,28	0,29
<i>ULK1</i>	1,06	0,85	<i>AQP1</i>	1,27	0,45
<i>ATR</i>	1,04	0,91	<i>HSPA5</i>	1,22	0,24
<i>TLR4</i>	1,04	0,74	<i>RAD51</i>	1,22	0,75
<i>RAD9A</i>	1,03	0,95	<i>TXN1</i>	1,22	0,85
<i>GSR</i>	1,01	0,95	<i>HSP90AA1</i>	1,21	0,18
<i>LDHA</i>	1,01	0,87	<i>HSPA4L</i>	1,17	0,21
<i>MRE11A</i>	1,01	0,86	<i>HSP90B1</i>	1,15	0,15
<i>GCLC</i>	1	0,86	<i>TNFRSF10B</i>	1,15	0,71
<i>CALR</i>	0,99	0,77	<i>EDN1</i>	1,14	0,77
<i>XPC</i>	0,99	0,81	<i>CASP1</i>	1,12	0,46
<i>ATG5</i>	0,98	0,68	<i>TNF</i>	1,11	0,73
<i>ATF4</i>	0,97	0,69	<i>CALR</i>	1,07	0,42

Tabela VIII

(Continuação)

<i>Disperse Red 1</i>			<i>Disperse Red 1</i>		
0,5 µg/kg			5 µg/kg		
Símbolo oficial do gene	<i>Fold change</i>	Valor-p	Símbolo oficial do gene	<i>Fold change</i>	Valor-p
<i>ATF6</i>	0,97	0,70	<i>FAS</i>	1,07	0,58
<i>ATF6B</i>	0,97	0,67	<i>DNAJC3</i>	1,05	0,59
<i>GRB2</i>	0,97	0,43	<i>PVR</i>	1,05	0,77
<i>TNFRSF1A</i>	0,97	0,67	<i>ATF4</i>	1,02	0,67
<i>TRP53</i>	0,97	0,55	<i>ATF6B</i>	1,02	0,80
<i>ATM</i>	0,96	0,67	<i>CD40LG</i>	1,02	0,85
<i>RAD17</i>	0,96	0,58	<i>CHEK2</i>	1,02	0,77
<i>DDB2</i>	0,95	0,44	<i>SLC5A3</i>	1,02	0,81
<i>GSTP1</i>	0,95	0,51	<i>TRP53</i>	1,01	0,82
<i>PVR</i>	0,95	0,73	<i>MRE11A</i>	1	0,97
<i>ARNT</i>	0,94	0,37	<i>GRB2</i>	0,99	0,98
<i>BID</i>	0,94	0,57	<i>LDHA</i>	0,99	0,99
<i>HMOX1</i>	0,94	0,77	<i>ATR</i>	0,98	0,66
<i>MCL1</i>	0,94	0,42	<i>DDB2</i>	0,98	0,90
<i>BECN1</i>	0,93	0,27	<i>HMOX1</i>	0,97	0,96
<i>ATG7</i>	0,92	0,33	<i>RAD17</i>	0,97	0,90
<i>BNIP3L</i>	0,92	0,21	<i>TLR4</i>	0,97	0,91
<i>GADD45A</i>	0,91	0,43	<i>XBPI</i>	0,97	0,97
<i>NFAT5</i>	0,91	0,36	<i>MCL1</i>	0,96	0,55
<i>TXNRD1</i>	0,91	0,14	<i>GCLC</i>	0,95	0,51
<i>DNAJC3</i>	0,9	0,14	<i>RAD9A</i>	0,95	0,77
<i>FAS</i>	0,9	0,36	<i>ARNT</i>	0,94	0,47
<i>HSPA5</i>	0,9	0,48	<i>PARP1</i>	0,94	0,30
<i>TNF</i>	0,9	0,97	<i>PRDX1</i>	0,94	0,78
<i>VEGFA</i>	0,9	0,33	<i>ATF6</i>	0,93	0,69
<i>NBN</i>	0,89	0,13	<i>ATG5</i>	0,93	0,53
<i>SQSTM1</i>	0,89	0,11	<i>ATM</i>	0,93	0,47
<i>CRP</i>	0,88	0,07	<i>BECN1</i>	0,93	0,51
<i>HSP90B1</i>	0,88	0,14	<i>CRP</i>	0,93	0,18

Tabela VIII

(Conclusão)

<i>Disperse Red 1</i>			<i>Disperse Red 1</i>		
0,5 µg/kg			5 µg/kg		
Símbolo oficial do gene	<i>Fold change</i>	Valor-p	Símbolo oficial do gene	<i>Fold change</i>	Valor-p
<i>HSPA4L</i>	0,88	0,09	<i>SQSTM1</i>	0,93	0,33
<i>RIPK1</i>	0,88	0,04	<i>TXNRD1</i>	0,93	0,38
<i>AKR1B3</i>	0,87	0,52	<i>ULK1</i>	0,92	0,57
<i>CASP1</i>	0,87	0,97	<i>ATG12</i>	0,91	0,35
<i>GCLM</i>	0,87	0,06	<i>GSR</i>	0,91	0,43
<i>PARP1</i>	0,87	0,00	<i>HSPA4</i>	0,91	0,21
<i>HUS1</i>	0,86	0,12	<i>SLC2A1</i>	0,9	0,47
<i>TXNL4B</i>	0,86	0,22	<i>BNIP3L</i>	0,89	0,23
<i>XBP1</i>	0,85	0,11	<i>TNFRSF1A</i>	0,89	0,23
<i>AQP4</i>	0,83	1,00	<i>NFAT5</i>	0,88	0,42
<i>HSP90AA1</i>	0,83	0,12	<i>XPC</i>	0,88	0,44
<i>ATG12</i>	0,82	0,05	<i>ATG7</i>	0,87	0,20
<i>DDIT3</i>	0,82	0,06	<i>CAR9</i>	0,87	0,86
<i>HSPA4</i>	0,82	0,01	<i>RIPK1</i>	0,87	0,15
<i>PRDX1</i>	0,81	0,20	<i>EPO</i>	0,86	0,52
<i>CAR9</i>	0,8	0,78	<i>FTH1</i>	0,86	0,05
<i>IFNG</i>	0,79	0,87	<i>NBN</i>	0,86	0,27
<i>EDN1</i>	0,77	0,10	<i>GCLM</i>	0,85	0,11
<i>FTH1</i>	0,75	0,00	<i>VEGFA</i>	0,83	0,26
<i>IL6</i>	0,75	0,15	<i>BID</i>	0,82	0,35
<i>NQO1</i>	0,73	0,13	<i>TXNL4B</i>	0,81	0,04
<i>CFTR</i>	0,7	0,05	<i>CHEK1</i>	0,8	0,76
<i>AQP2</i>	0,69	0,05	<i>HUS1</i>	0,79	0,11
<i>EPO</i>	0,69	0,05	<i>AKR1B3</i>	0,76	0,21
<i>SLC9A3</i>	0,69	0,05	<i>GADD45A</i>	0,76	0,17
<i>CCL12</i>	0,68	0,84	<i>DDIT3</i>	0,75	0,02
<i>CD40LG</i>	0,68	0,24	<i>AQP4</i>	0,69	0,69
<i>TXN1</i>	0,65	0,27	<i>NQO1</i>	0,66	0,08

Os dados de expressão relativa foram normalizados pelos genes endógenos *GAPDH* e *HSP90AB1*.

7. DISCUSSÃO

Populações humanas e outras espécies animais que habitam áreas urbanas estão muitas vezes expostas a águas sob a influência de atividades têxteis e, conseqüentemente, podem estar expostas a compostos nocivos à saúde, dentre os quais os corantes (Carneiro et al. 2010). A frequente identificação de compostos corantes nos corpos fluviais, mesmo após tratamento por métodos convencionais (pré-cloração, floculação, decantação e flotação), é forte indicação de que esses compostos podem atingir populações que utilizam essas águas para seu abastecimento (Carneiro et al. 2010; Zocolo et al. 2015; Vacchi et al. 2016a; 2016b).

No presente estudo foram avaliadas amostras de águas coletadas na região do Polo Têxtil de Americana – SP (Ribeirão Quilombo e ETE – Carioba). Foi observada expressiva coloração (PCU) na amostra do Ribeirão do Quilombo, com valores seis vezes maiores que aqueles definidos pela legislação brasileira vigente (CONAMA, 2005). Embora não existam valores de referência de PCU (CONAMA, 2011) para efluentes, os encontrados para as águas da ETE - Carioba (amostra analisada) foram superiores aos do Ribeirão Quilombo. O aumento de coloração dessas águas pode ser atribuído aos compostos corantes *Disperse Blue 60*, *Disperse Red 60* e *Disperse Yellow 7* detectados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Ferreira et al. comunicação pessoal, manuscrito em preparação). Anteriormente, no entanto, Vacchi et al., (2016a) haviam também descrito a presença dos corantes *Disperse Blue 291*, *Disperse Blue 373*, *Disperse Orange 30*, *Disperse Red 1*, *Disperse Violet 93* e *Disperse Yellow 3*, em concentrações entre 0,01 e 2,81 $\mu\text{g/L}^{-1}$, além de diversas aminas aromáticas (2,4-diaminotolueno, 2,5-metoximetilanilina, 3,3-diclorobenzidina, 4,4-diaminodimetano, 4-nitroanilina e anilina) em amostras de água coletadas nos mesmos locais.

Um fator importante que deve ser considerado em análises de efluentes é a variação semanal da atividade têxtil, tanto na quantidade quanto no tipo de compostos descartados. Além dos corantes, outras substâncias utilizadas no processo de tingimento (agentes dispersantes e antiespumantes, agentes utilizados para oxidação e redução, bases, sais, etc.) podem também contribuir para a poluição das águas (European Commission 2003) e, dentre esses, os sais estão entre os resíduos mais preocupantes na poluição ambiental causada por efluentes têxteis (Alkaya & Demirer 2014). O aumento na concentração dos diferentes compostos nas águas se agrava, sobretudo, em épocas de severa estiagem, quando são naturalmente concentrados (Benotti et al. 2010). No ano de 2014 (período da coleta das amostras aqui testadas), foi detectada menor intensidade de chuva que a média histórica (1991 – 2013) na região de Americana - SP (Unidade Hidrográfica de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHI05, porção paulista das bacias hidrográficas Piracicaba, Capivari e Jundiaí) (CETESB 2015c). Anteriormente, em 2012, no período chuvoso de fevereiro, nenhum corante foi detectado em amostras de água do Rio Piracicaba. No entanto, na estiagem de julho, foram identificados diversos compostos, dentre os quais o *Disperse Blue 373*, o *Disperse Red 1* e o *Disperse Violet 93* (Zocolo et al. 2015). Essas informações mostram claramente a influência da sazonalidade na concentração de compostos químicos em águas fluviais.

Portanto, em virtude da ampla utilização pela indústria, do descarte de resíduos dos corantes dispersos no ambiente e da possibilidade desses compostos estarem presentes na água de abastecimento de várias cidades, numerosos pesquisadores têm direcionado esforços no sentido de avaliar o potencial toxicológico, mutagênico e carcinogênico desses compostos. Foi recentemente descrito o aumento de danos primários no DNA (teste do cometa) de linhagem celular de peixe (RTL-W1) e de mutações em *Samonella typhimurium* (teste de Ames) induzido por águas do Ribeirão Quilombo e da ETE – Carioba (Vacchi et al. 2016a). Em 2007, Alves de Lima et al. foram os primeiros

investigadores a demonstrar que amostras de águas utilizadas para abastecimento humano e coletadas do Ribeirão dos Cristais, também sob a influência de indústrias têxteis, foram capazes de induzir lesões pré-neoplásicas em cólon de ratos. Na ocasião, os autores atribuíram a atividade carcinogênica à presença dos corantes *Disperse Blue 373*, *Disperse Orange 37* e *Disperse Violet 93* na água. No entanto, utilizando a mesma metodologia empregada por Alves de Lima et al (2007), não foi observada, no presente estudo, a presença de focos de criptas aberrantes em cólon de ratos tratados com água do Ribeirão Quilombo e da ETE – Carioba. Assim sendo, pode-se sugerir que os diferentes corantes encontrados, ou suas concentrações nas amostras testadas, não apresentaram atividade neoplásica. O teste do foco de criptas aberrantes permite a detecção de agentes capazes de iniciar o processo carcinogênico, mas especialmente daqueles com a capacidade de promover a proliferação das células mutadas. Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade de os compostos terem atuado apenas como agentes iniciadores, mas não como promotores da carcinogênese. De fato, o potencial mutagênico das amostras testadas já havia sido confirmado por Vacchi et al. (2016a).

Embora não tenham sido observadas lesões estereoscópicas em cólon, a análise microscópica do tecido hepático mostrou o acúmulo de glicogênio nos hepatócitos dos animais tratados com as amostras de água do Ribeirão Quilombo e da ETE – Carioba. Da mesma forma, Al-Eryani et al. (2015) haviam encontrado aumento de esteatose, indicativo de toxicidade hepática, em animais expostos a diversos poluentes ambientais, dentre os quais corantes azoicos. Já em 1971, Moulin & Daoust, mostraram que a exposição ao corante azo *4-dimethylaminoazobenzene* alterava a atividade normal da enzima responsável pela clivagem do glicogênio (glucose-6-fosfatase) e promovia o acúmulo desse polissacarídeo no fígado de ratos no processo de carcinogênese hepática.

Com o objetivo de contribuir para a elucidação dos mecanismos de toxicidade dos corantes têxteis, foram selecionados para este estudo dois dos compostos mais

frequentemente encontrados nas águas de descarte dessas indústrias e cujas atividades citotóxicas e mutagênicas já haviam sido reportadas *in vitro*: o *Disperse Red 1* (DR1) e o *Disperse Blue 291* (DB291) (Umbuzeiro et al., 2005; Tsuboy et al. 2007; Zocolo et al. 2015; Vacchi et al. 2016a; 2016b).

Inicialmente, foi possível identificar, macroscopicamente, que o DR1 e o DB291 apresentavam diferente distribuição pelo organismo: enquanto 24 h após o tratamento o DR1 encontrava-se amplamente distribuído, mas, sobretudo, nos órgãos abdominais e tecido adiposo, o DB291 concentrava-se no intestino dos animais. Essa diferença pode ser atribuída à característica mais hidrofóbica do DB291, fato que teria reduzido sua absorção em meio a soluções fisiológicas (provavelmente envolvido em micelas anfipáticas), promovendo assim sua excreção. Por outro lado, a localização no cólon pode ter ocorrido devido à intensa metabolização do DB291 por bactérias intestinais (Chung & Cerniglia, 1992).

No que se refere ao potencial mutagênico, os dois corantes foram capazes de induzir aumento na frequência de células micronucleadas em medula óssea de camundongos. Da mesma forma, outros pesquisadores já haviam observado *in vitro* maior efeito mutagênico do DR1 (Tsuboy et al. 2007; Chequer et al. 2009). Biologicamente, o aumento de micronúcleos pode corresponder a lesões aneugênicas ou clastogênicas. No caso desses corantes, há evidências que confirmam a capacidade de induzir quebras no DNA, uma vez que apresentaram resultados positivos no teste do cometa (Tsuboy et al. 2007; Oliveira et al. 2010; Fernandes et al. 2015). Considerando a estrutura química planar de compostos corantes, pode-se supor que estes tenham atuado como agentes intercalantes no DNA (Uliana et al. 2013). Sabe-se que, ligações covalentes, intercalações ou interferências no metabolismo genômico (replicação ou reparo) podem, *per se*, levar à quebra cromossômica, resultando em fragmentos acêntricos que posteriormente formam os micronúcleos (Ferguson & Denny, 2007; Proudlock 2016). Em artigo recente, Fenech et

al., (2016) listaram agentes capazes de se intercalarem no DNA como possíveis causadores do aumento da frequência de micronúcleos. Por outro lado, não pode ser descartado que o aumento de células micronucleadas tenha ocorrido por atividade aneugênica dos corantes. Para que isso fosse possível, haveria a necessidade de realizar o teste do micronúcleo utilizando-se a técnica de FISH com sondas centroméricas.

Na concentração mais alta testada (500 mg/kg p.c.), nenhum dos corantes apresentou potencial mutagênico pelo teste do micronúcleo. Entretanto, tanto o DR1 como o DB291 mostraram significativa atividade citotóxica (redução do número de PCE em relação a NCE) nessa concentração. Resultados similares foram anteriormente relatados por diversos pesquisadores (Rajaguru et al. 1999; Chequer et al. 2009; Oliveira et al. 2010). Em modelo *in vivo*, Rajaguru et al. (1999) reportaram o efeito citotóxico do *Direct Red 2*; *in vitro*, Oliveira et al. (2010) descreveram o reduzido número de células para análise, quando a cultura foi tratada com maiores concentrações dos corantes *Disperse Red 1*, *Disperse Red 13* e *Disperse Orange 1*.

Além das concentrações definidas a partir de experimentos piloto de toxicidade, o efeito mutagênico do DR1 foi avaliado em protocolo que levou em conta as concentrações encontradas em rios. Com margem de segurança, foram testadas as concentrações de 0,5 e 5 µg/kg p.c., respectivamente, 10 e 100 vezes maiores que as identificadas nas amostras de águas. Nessas condições, o corante apresentou resultados negativos, não induzindo aumento na frequência de células micronucleadas. Possivelmente, essa ausência de efeito mutagênico foi mediada por uma detoxificação mais eficiente, sobretudo por estar em menor concentração no organismo. De fato, enzimas metabolizadoras, como a azoredutase produzida no fígado e por bactérias intestinais, têm a capacidade de clivar a ligação azo (N=N) dos corantes, diminuindo sua interação com o DNA (Chung & Cerniglia, 1992; Ferraz et al. 2011; Uliana et al. 2013). Essa detoxificação, no entanto, não elimina completamente a possibilidade do corante induzir mutações, pois a clivagem da molécula

gera produtos como aminas aromáticas (Umbuzeiro et al., 2005b; Chequer et al. 2011), as quais podem formar adutos DNA ou outras lesões no DNA (Geacintov & Broyde 2010). Portanto, pode-se sugerir que o mecanismo de mutagenicidade do DR-1 seria mediado pelas enzimas O-acetyltransferase e azoreductase via processos de nitro-redução e acetilação (Ferraz et al. 2010). Pelo teste do cometa, foi possível detectar que o DR1 foi capaz de induzir danos primários no DNA de células hepáticas, mas apenas na concentração de 5 µg/kg p.c. Contudo, não é possível definir se tal efeito foi mediado pela molécula original do corante ou por um subproduto gerado pela metabolização hepática.

Os resultados produzidos pelo presente estudo reforçam a necessidade da utilização de diversos protocolos e testes para se definir pela capacidade, ou não, de um composto químico induzir alterações genéticas. Embora não tenha sido observado efeito genotóxico do DR1 na concentração de 0,5 µg/kg p.c. pelo ensaio do cometa, foi clara sua interferência na modulação da expressão gênica. O observado aumento na expressão do gene *IL1B*, por exemplo, pode promover o aumento da produção citocina pró-inflamatória interleucina 1-beta (*IL1B*), a qual tem papel chave em processos inflamatórios (Dinarello 2011), como em resposta a danos no DNA (Logan et al. 2007; Kanarek et al. 2014). Por outro lado, o aumento nos níveis transcricionais de *CDKN1A* (quinase dependente de ciclina - P21), pode ter efeito direto sobre o controle do ciclo celular, sobretudo após a indução de danos no DNA. Após a sinalização de lesão na molécula, a proteína P21 orchestra vários eventos celulares, como o bloqueio do ciclo celular (G1/S), a inibição direta da replicação do DNA e regulação de processos celulares fundamentais, como apoptose e transcrição gênica. Segundo Cazzalini et al. (2010), em situações de baixos níveis de danos no DNA, a P21 auxilia em processos de reparo, enquanto sob altos níveis direciona a células à morte. Assim sendo, no conjunto, nossos dados sugerem que para a menor concentração do DR1 (0,5 µg/kg p.c.) pode ter ocorrido parada no ciclo celular devido à elevada expressão da P21. Porém, a diminuição da expressão da P21 após

exposição à maior concentração do corante (5 µg/kg p.c.), e promovida pelo aumento da genotoxicidade, teria direcionado à via de morte celular .

Outro dado importante obtido em células do sangue periférico foi o aumento da expressão dos genes *BAX* (pró-apoptótico) e *BCL2* (antiapoptótico), 24h após o tratamento, com a menor concentração do DR1. O aumento da expressão de *BAX* sinaliza resposta a danos no DNA e, por consequência, morte celular por apoptose. No entanto, ao mesmo tempo, talvez como mecanismos de defesa, houve aumento da expressão do *BCL2* para evitar que grande quantidade de células sanguíneas entrasse em apoptose (Teijido & Dejean 2010).

Nas condições experimentais utilizadas, o DB291 não induziu dano primário no DNA e tampouco alterações transcricionais nas baixas concentrações (0,5 e 5 µg/kg p.c.). No entanto, recomenda-se novas avaliações, sobretudo no nível molecular, pois a literatura mostra que este corante induz alterações no padrão de leitura do DNA (mutações *frame-shift*) e todos os tipos de substituições de pares de bases, com predominância das transições T·A → A·T e C·G → T·A e transversão C·G → A·T, avaliadas pelo ensaio de Ames (Umbuzeiro et al. 2005b).

Em linhas gerais, os dados mostraram que os corantes têxteis *Disperse Red 1* e *Disperse Blue 291* foram capazes de promover instabilidade genética e que, portanto, são fatores de risco para populações expostas. Reforça-se, assim, o argumento de que novas estratégias precisam ser definidas para melhor eficiência no descarte dos corantes têxteis em cursos fluviais.

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.

ANEXO I

Capítulo de livro: “Exposição a corantes: o perigo toxicogenético por trás das cores”.

Corantes: Caracterização Química, Toxicológica, Métodos de Detecção e Tratamento.

Organizadoras: Maria V. B. Zanoni e Hideko Yamanaka, Editora UNESP (2016). Acesso

disponível em: www.culturaacademica.com.br/catalogo-detalhe.asp?ctl_id=589

8

EXPOSIÇÃO A CORANTES: O PERIGO TOXICOGENÉTICO POR TRÁS DAS CORES

Fábio Henrique Fernandes
Daisy Maria Fávero Salvadori

8.1 Introdução

Substâncias com propriedades coloríferas são amplamente utilizadas pelas indústrias para tornar alimentos, bebidas e roupas mais atraentes. Conseqüentemente, a exposição diária a esses compostos atinge tanto os seres humanos como outras diversas espécies animais. Atualmente, a literatura científica chama a atenção para os possíveis efeitos tóxicos de corantes, incluindo aqueles autorizados por agências reguladoras. Este problema se agrava, uma vez que ainda não é claro o mecanismo de ação desses compostos, e sob quais condições apresentam efeito nocivo à saúde (Carocho et al., 2014). Assim sendo, os estudos *in vivo*, quer em populações ocupacionalmente expostas ou em modelos animais, podem fornecer informações mais precisas sobre os efeitos da exposição aos corantes, pois possibilitam avaliar vias metabólicas, a biodisponibilidade, os processos de excreção, entre outros fatores que podem interferir diretamente na atividade desses compostos. Neste capítulo será dada especial ênfase para o potencial toxicogenético (efeito tóxico sobre o DNA e cromossomos) dos corantes alimentares, sintéticos e naturais, têxteis e aqueles utilizados na indústria cosmética.

8.2 Corantes alimentares

Os corantes alimentares são aditivos adicionados a fim de compensar perdas de cor após a exposição à luz, ar, umidade e variações de temperatura; para aprimorar as cores que ocorrem naturalmente; e para adicionar cor a alimentos que de outra forma seriam incolores ou com colorido diferente. Além de corantes naturais de origem vegetal, compostos sintéticos têm sido também muito utilizados pela indústria alimentícia, levando agências como a *European Food Safety Authority* (EFSA) a reavaliarem os valores de ingestão diária aceitável (IDA), na tentativa de prevenir problemas relacionados a uma possível toxicidade. Por outro lado, várias agências e comissões mundiais que regulam o uso de aditivos alimentares (por exemplo, International Conference on Harmonization, Organization for Economic Co-operation and Development e European Food Safety Authority) indicam, ao invés de um, a realização de uma bateria de testes para se definir a atividade toxicogênica do composto. Isto ocorre porque há evidências que nenhum teste isolado pode dar prova completa da segurança do aditivo. Por conseguinte, testes mínimos são recomendados a fim de garantir a ausência de efeitos tóxicos desses produtos.

Dentre as principais classes de corantes alimentares sintéticos estão os (i) azo corantes, (ii) os xantenos e os (iii) trifenilmetanos. No início dos anos 2000, Sasaki et al. (2002), utilizando o teste do cometa, relataram o efeito genotóxico dos corantes azo, *allura red* (E129), *amaranth* (E123), *tartrazine* (E102) e *new cocchine* (E124), em baixas e altas doses (10 e 100 mg/kg), em órgãos do sistema gastrointestinal de camundongos. Parte desses resultados foi confirmada por estudo similar utilizando o *amaranth*. Contudo, foi observada diferença de toxicidade entre camundongos e ratos (Shimada et al., 2010) Por outro lado, estudos realizados mais recentemente, não detectaram efeito mutagênico para o *allura red* (administrado via intraperitoneal) (Abramsson-Zetterberg; Ilbäck, 2013) e para o *amaranth* e o *tartrazine* administrados por via oral (sonda gástrica) (Poul et al., 2009), em células do estômago e do sangue periférico de camundongos (teste do micronúcleo). Uma possível explicação para essa diferença poderia

estar no tipo de danos genéticos detectados pelos dois testes: enquanto o teste do cometa (*single cell gel assay*) mensura danos primários e podem ser ainda reparados na molécula de DNA (quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, entre outros), os o teste do micronúcleo avalia alterações cromossômicas não reparáveis, resultantes de eventos clastogênicos (que causam quebra cromossômica) e aneugênicos (que causam alterações na segregação dos cromossomos durante a mitose). Para melhor esclarecer, enquanto o teste do cometa detecta potencial genotóxico, o do micronúcleo o potencial mutagênico do composto-teste. Desta forma, conclui-se que os corantes citados apresentam efeito genotóxico (têm capacidade de danificar a molécula de DNA), mas não mutagênico (i.e, tais danos podem ser reparados antes de se fixarem no nível cromossômico). De acordo com Thomas e Adegoke (2015), em artigo de revisão, não há dados na literatura que evidenciem o efeito carcinogênico dos corantes *allura red*, *amaranth* e *tartrazine*.

A ausência de potencial genotóxico (Sasaki et al., 2002) e mutagênico (Poul et al., 2009) havia sido descrita para o corante *Sunset yellow FCF* (E110). No entanto, em 2012, foi demonstrado que esse composto induziu o aumento de trocas entre cromátides irmãs em células somáticas (medula óssea) e germinativas (espermátocitos) de camundongos, 24h após tratamento oral único (0,325, 0,65 ou 1,3 mg/kg p.c.) e após doses repetidas de 0,325 mg/kg (por 1, 2 e 3 semanas) (Sayed et al., 2012). É importante destacar, contudo, que o teste de trocas entre cromátides irmãs não está entre os ensaios recomendados pelas agências regulatórias, uma vez que o significado biológicos dessas alterações não está completamente elucidado. Outro corante alimentar amarelo, o *quinoline yellow* (E104), embora tenha apresentado efeitos citotóxicos em ratos (aumento dos níveis renais de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, redução da atividade enzimática de superóxido dismutase e alterações histológicas nos rins), na concentração de 2,5 mg/kg p.c. (IDA 0 – 4 mg/kg p.c.) e após tratamento de três semanas (Fouad; Alobaid; Al-Jafary, 2013), não há relatos sobre o potencial mutagênico *in vivo*. Somente foi descrito aumento de danos no DNA (teste do cometa) e de micronúcleos *in vitro* (Macioszek; Kononowicz, 2004). Não há, também, evidências de carcinogenicidade (EFSA, 2009).

A literatura mostra que corantes da classe xanteno, como o *phloxine*, o *rose bengal* e o *erythrosine* (E127), foram capazes de induzir danos no DNA em células do estômago glandular, cólon e bexiga de camundongos, quando analisados 3 h após o tratamento (10 ou 100 mg/kg). No entanto, essas alterações não persistiram nos animais avaliados 24h após a exposição aos compostos, sugerindo que os danos no DNA podem ter sido reparados pelo eficiente sistema de defesa celular (Sasaki et al., 2002). De fato, o *erythrosine* administrado por via intraperitoneal não induziu aumento de micronúcleo e aberração cromossômica em células de medula óssea e sangue periférico de camundongos, nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg p.c. (Zijno et al., 1994). Estes achados sugerem, portanto, a ausência de perigo toxicogenético do *erythrosine*. É importante salientar que, após revisar diversos estudos sobre esse composto, a European Food Safety Authority (EFSA, 2011) manteve o valor da IDA em 0,1 mg/kg p.c.

Outros importantes corantes sintético alimentares, da classe dos trifenilmetanos, o *fast green FCF* (E143), o *brilliant blue FCF* (E113) e o *indigocarmine* (E132), não apresentaram efeito genotóxico (teste do cometa) em células de estômago, cólon, fígado, rim, bexiga, pulmão e medula óssea de camundongos avaliados 3 e 24 h após tratamento por via oral (Sasaki et al., 2002). Adicionalmente, a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2010; 2014) em revisões recentes, relatou que não há perigo carcinogênico para os corantes *brilliant blue FCF* e *indigocarmine*.

Atualmente, grande esforço tem sido feito no sentido de substituir os corantes sintéticos pelos naturais (Carocho et al., 2014), especialmente no Brasil, onde é enorme a diversidade vegetal. Entre os compostos mais promissores estão as antocianinas, que pertencem à classe dos flavonoides, e que vêm recebendo crescente atenção. No entanto, sabe-se, hoje, que o fato do composto ter origem vegetal não garante que seja inócuo para a saúde. Realmente, dados na literatura mostram que, de acordo com a estrutura e grau de pureza, as antocianinas podem apresentar tanto efeito genotóxico como quimioprotetor. Azevedo et al., (2003) mostraram que uma antocianina adquirida comercialmente induziu aumento de danos primários no DNA de células do sangue

periférico de camundongos tratados com o composto na dose de 50 mg/kg p.c. Por outro lado, a *delphinidin*, uma antocianina encontrada na berinjela (*Solanum melanogeta*), apresentou atividade antimutagênica sobre os efeitos da ciclofosfamida (composto antineoplásico com reconhecida atividade mutagênica), após exposição oral *in vivo* (Azevedo et al., 2007). Outro exemplo de diferença no mecanismo de ação, desta feita apenas com relação ao potencial quimioprotetor, foi relatado para a *bixin*, carotenoide encontrando no urucum (*Bixa orellana* L.). Este corante apresentou atividade protetora apenas sobre determinada droga e conforme o tecido analisado. Assim, foi evidenciado que a *bixin* protegeu células do cólon de ratos tratados com a 1,2 dimetilhidrazina (reconhecido carcinógeno para o cólon) (Agner et al., 2005), mas não de fígado, dos danos induzidos pela N-dietilnitrosamine (reconhecido hepatocancerígeno) (Agner et al., 2004). Por outro lado, foi relatado que o extrato de beterraba (*Beta vulgaris*) contendo 0,0025% de *betanin* (E162) foi capaz de reduzir a ação do hepatocancerígeno (Kapadia et al., 2003).

Ainda que existam controvérsias sobre os efeitos dos corantes naturais, os principais obstáculos para o uso desses compostos são a instabilidade da estrutura (pH, temperatura, oxidação), a disponibilidade, custo elevado e a carência de investigações sobre efeitos toxicogênicos (Carocho et al., 2014).

8.3 Corantes têxteis

A utilização de corantes na indústria têxtil tem aumentado devido às exigências dos consumidores pela diversidade de cores, resistência à exposição a luz, lavagem e a transpiração (Guaratini; Zanoni, 2000). No entanto, no processo industrial de coloração, resíduos dos corantes são frequentemente descartados em rios e, mesmo após o tratamento de água, o potencial toxicológico desses compostos não é completamente eliminado (Oliveira et al., 2010). Pelo contrário, dados na literatura mostram que os produtos clorados gerados pelo tratamento convencional da água podem ser mais tóxicos do que os corantes co-

merciais (Vacchi et al., 2013). Portanto, a população humana e outros organismos vivos podem ser expostos aos corantes têxteis, inclusive pela água de beber.

Estudos sobre o potencial carcinogênico de águas fluviais sob a influência de atividades têxteis têm demonstrado que compostos descartados são capazes de induzir lesões pré-neoplásicas em cólon (Alves de Lima et al., 2007), alterações hematológicas (Sharma et al., 2007) e aberrações cromossômicas (Ben Mansour et al., 2012) em roedores. No entanto, avaliações em mamíferos, de corantes isolados, são raras. Em 2010, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (Iarc, 2010) relatou que vários compostos corantes apresentam potencial cancerígeno, dentre os quais a auramina e o dicloridrato de benzidina, que induziram hepatomas em camundongos, e papilomas e carcinoma de bexiga e adeno-carcinoma de cólon em ratos. Recentemente, Oliveira et al., (2015) relataram que os corantes *direct black 38*, *reactive blue 15*, *reactive orange 16* e *vat green 3* induziram malformações durante o desenvolvimento embrionário e larval em *zebrafish* (*Danio rerio*). Efeitos genotóxicos (teste do cometa) foram também observados em peixes *Cyprinus Carpio* expostos ao corante *acid red* (Deepa et al., 2011).

Maior escassez de dados sobre a atividade toxicogênica dos corantes, ocorre com relação a células da linhagem germinativa. Até o momento, foram relatados apenas os efeitos deletérios dos corantes vermelhos, *congo red* e *disperse red 1* (Gray; Ostby, 1993; Fernandes; Bustos-Obregon; Salvadori, 2015), e da água de efluentes sob a influência de atividades têxteis (Suryavathi et al., 2005), em roedores.

8.4 Corantes cosméticos

A *ortho-toluidine* é uma substância utilizada para a síntese de vários compostos, incluindo mais de 90 tipos de corantes (corantes das classes azo, triarilmetano, sulfurosos e compostos índigos), dentre os quais produtos capilares. Classificada como carcinógena para o homem (Iarc, 2012), a *toluidine* tem sido detectada em amostras de sangue de cabeleireiros, em ambas as formas estereoquímicas: orto e meta. Além

disso, sua concentração variou de acordo com a frequência das atividades profissionais (Johansson et al., 2015). O potencial toxicogenético da *o-toluidine* foi avaliado em camundongos (estômago, fígado, bexiga, pulmão e cérebro) e em ratos (estômago, cólon, rim e bexiga urinária), tendo sido confirmado o efeito genotóxico da substância (Sekiashi et al., 2002). Como até então os resultados sobre o potencial carcinogênico de produtos capilares haviam sido obtidos por delineamentos experimentais que utilizaram administração por via oral, em 2004, Nohynek et al. chamaram a atenção sobre a importância da avaliação por meio de situações de exposição tópica e ocupacional. No entanto, os dados sobre a possível atividade cancerígena dos corantes capilares continuam quase que restritos a modelos animais, sendo ainda inclusivos os resultados em seres humanos (Saitta et al., 2013). Recentemente, contudo, foi relatada a associação entre a exposição ocupacional à *o-toluidine* e o câncer de bexiga (Carreón et al., 2014).

8.5 Considerações finais

A exposição a vários compostos com propriedades corantes ocorre diariamente por meio de diversos produtos, algumas vezes nocivos, podendo dar origem a uma série de doenças, dentre as quais, o câncer. Para definir o real perigo da exposição a um determinado corante, há necessidade da elaboração de estratégias a partir de testes validados por agências reguladoras internacionais, e que permitem a avaliação do efeito do composto sobre inúmeros parâmetros fisiológicos, bioquímicos, genéticos, entre outros. Por outro lado, deve estar sempre acessível ao consumidor a informação sobre a presença e quantidade de corantes nos produtos adquiridos. Finalmente, é importante que estudos continuem a ser realizados para identificar situações de risco ambiental e ocupacional, e para a busca de novos compostos com atividade corante e sem efeito deletério para a saúde humana. Nesse sentido, merece destaque o potencial promissor de substâncias de origem vegetal e de fácil acesso à população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ILBÄCK, N. The synthetic food colouring agent Allura Red AC (E129) is not genotoxic in a flow cytometry-based micronucleus assay *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology* v. 59, p. 86–89, set. 2013.
- AGNER, A. R. et al. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 42, n. 10, p. 1687–1693, out. 2004.
- AGNER, A. R. et al. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. *Mutation Research*, v. 582, n. 1–2, p. 146–154, 4 abr. 2005.
- ALVES DE LIMA, R. O. et al. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* v. 626, n. 1–2, p. 53–60, jan. 2007.
- AZEVEDO, L. et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* Contains paper on Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use with food and food supplements (pp.1625-1649). v. 41, n. 12, p. 1671–1676, dez. 2003.
- AZEVEDO, L. et al. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 45, n. 5, p. 852–858, maio 2007.

- BEN MANSOUR, H. et al. Alteration of *in vitro* and acute *in vivo* toxicity of textile dyeing wastewater after chemical and biological remediation. *Environmental Science and Pollution Research* v. 19, n. 7, p. 2634–2643, ago. 2012.
- CAROCHO, M. et al. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* v. 13, n. 4, p. 377–399, 1 jul. 2014.
- CARREÓN, T. et al. Bladder cancer incidence among workers exposed to o-toluidine, aniline and nitrobenzene at a rubber chemical manufacturing plant. *Occupational and environmental medicine*, v. 71, n. 3, p. 175–182, mar. 2014.
- DEEPA, V. et al. Genotoxicity evaluation of commercially available acid red dye by comet assay in fish (*Cyprinus carpio*). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* v. 6, n. 1, p. 69–72, 15 dez. 2011.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive. *EFSA Journal* v. 8, n. 11, p. 1853, nov. 2010.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on the reevaluation of Erythrosine (E 127) as a food additive. *EFSA Journal* v. 9, n. 1, p. 1854, jan. 2011.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the re-evaluation of Indigo Carmine (E 132) as a food additive. *EFSA Journal* v. 7, n. 12, p. 3768, jul. 2014.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the re-evaluation of Quinoline Yellow (E 104) as a food additive. *EFSA Journal* v. 9, n. 1, p. 1329, nov. 2009.
- FERNANDES, F. H.; BUSTOS-OBREGON, E.; SALVADORI, Daisy M. F.. Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. *Reproductive Toxicology* v. 53, p. 75–81, jun. 2015.

- FOUAD, Dalia; ALOBAID, Hessa; AL-JAFARY, Abdulaziz A. Effect of melatonin on the oxidative stress induced by the food additive (C.I. Food Yellow 3) on some blood parameters and antioxidant enzymes in male rat kidney. *Life Science Journal* v. 10, n. 4, p. 343–350, fev. 2013.
- GRAY, L. E.; OSTBY, J. S. 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. *Toxicological Sciences* v. 20, n. 2, p. 177–183, fev. 1993.
- GUARATINI, C. C.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *Química Nova* v. 23, n. 1, p. 71–78, fev. 2000.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (Org.). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 F, chemical agents and related occupations. Lyon: IARC press, 2012. 599 p.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (Org.). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 99, some aromatic amines, organic dyes, and related exposures. Lyon: IARC press, 2010. 692 p.
- JOHANSSON, G. M. et al. Exposure of hairdressers to ortho- and meta-toluidine in hair dyes. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 72, n. 1, p. 57–63, 1 jan. 2015.
- KAPADIA, G. J. et al. Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacological Research* v. 47, n. 2, p. 141–148, fev. 2003.
- MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline Yellow (E 104) and Brilliant Black BN (E 151). *Cellular & Molecular Biology Letters*, v. 9, n. 1, p. 107–122, jan. 2004.

- NOHYNEK, Gerhard J et al. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology* v. 42, n. 4, p. 517–543 , abr. 2004.
- OLIVEIRA, G.A.R. et al. 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. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* v. 703, n. 2, p. 200–208 , dez. 2010.
- OLIVEIRA, G.A.R. et al. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1 ago. 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.3202/abstract>>. Acesso em: 14 out. 2015.
- POUL, M. et al. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chemical Toxicology* v. 47, n. 2, p. 443–448 , fev. 2009.
- SAITTA, P. et al. Is There a True Concern Regarding the Use of Hair Dye and Malignancy Development? *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, v. 6, n. 1, p. 39–46 , jan. 2013.
- SASAKI, Y.F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* v. 519, n. 1–2, p. 103–119 , 26 ago. 2002.
- SAYED, H. M. et al. The modifying effect of selenium and vitamins A, C, and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* v. 744, n. 2, p. 145–153 , 15 maio 2012.
- SEKIHASHI, K. et al. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutation Research*, v. 517, n. 1–2, p. 53–75, 27 maio 2002.

- SHARMA, S. et al. Toxicity assessment of textile dye wastewater using swiss albino rats. *Australasian Journal of Ecotoxicology* v. 13, p. 81–85, mar. 2007.
- SHIMADA, C. et al. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, v. 35, n. 4, p. 547–554, ago. 2010.
- SURYAVATHI, V. et al. Acute toxicity of textile dye wastewaters (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice. *Reproductive Toxicology* v. 19, n. 4, p. 547–556, abr. 2005.
- THOMAS, O. E; ADEGOKE, O. A. Toxicity of food colours and additives: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* v. 9, n. 36, p. 900–914, set. 2015.
- VACCHI, F. I. et al. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. *Science of The Total Environment* v. 442, p. 302–309, jan. 2013.
- ZIJNO, A. et al. An assessment of the *in vivo* clastogenicity of erythrosine. *Food and Chemical Toxicology* v. 32, n. 2, p. 159–163, fev. 1994.

ANEXO II

Artigo publicado na revista *Reproductive Toxicology*, volume 53, páginas 75 - 81, em junho de 2015. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.04.002.



Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells



Fábio Henrique Fernandes^{a,*}, Eduardo Bustos-Obregon^b, Daisy Maria Fávero Salvadori^c

^a Universidade Estadual Paulista, Biosciences Institute, Department of Genetics, Rubião Junior, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

^b Universidad de Chile, Medical School, Av. Independencia 1027, Santiago, Chile

^c Universidade Estadual Paulista, Medical School, Department of Pathology, Rubião Junior, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2014

Received in revised form 28 March 2015

Accepted 5 April 2015

Available online 13 April 2015

Keywords:

Azo dye

Reproductive tract male

Environmental exposure

Fertility

ABSTRACT

Disperse Red 1 (DR1), which is widely used in the textile industry, is an azo dye that contributes to the toxicity and pollution of wastewater. To assess the toxic effects of DR1 on reproduction, sexually mature male mice (*Mus musculus*, strain CF-1) were orally (gavage) treated with single doses of the compound at 20, 100 and 500 mg/kg body weight. Testicular features and sperm parameters were evaluated 8.3, 16.6 and 24.9 days after treatments. In addition to testicular toxicity caused by the dye, the data clearly showed an increased frequency of sperm with abnormal morphology and decreased fertility. An increased amount of DNA damage was also detected in testis cells 16.6 and 24.9 days after treatments with 100 and 500 mg/kg. This study demonstrated the toxic and genotoxic effects of DR1, indicating the harmful activity of this dye on reproductive health.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO III

Certificado de aprovação do protocolo do estudo pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina – UNESP – Câmpus de Botucatu



Certificado

CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1002/2013) "Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria têxtil e do corante Disperse Red 1 em medida óssea de camundongos e cólon de ratos", a ser conduzido por Fábio Henrique Fernandes, orientado pela Prof^a. Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori, com o Apoio Técnico de Paulo Cesar Georgete", está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "camundongos e ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 28/02/2013

Prof^a Dr^a Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEUA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 13.618-970
Fone: (14) 3880-1608/3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 23 de setembro de 2014

• Of. 35/2014-CEUA

Ilustríssima Senhora
Prof^a Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Em relação ao Projeto de Pesquisa (Protocolo 1002/2013) "Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria têxtil e do corante Disperse Red 1 em medula óssea de camundongos e cólon de ratos.", conduzido por Fábio Henrique Fernandes, orientado por Vossa Senhoria, informo que foram AUTORIZADAS as seguintes alterações:

- Inclusão de dois novos compostos-teste para análise, o Disperse Blue 291 e amostra de água de efluente descartado no Rio Quilombo pela Estação de Tratamento de Esgoto;
- Inclusão de 50 camundongos e 60 ratos para as análises dos compostos-testes descritos acima;
- Inclusão de 50 camundongos para avaliação com o Disperse Red 1;
- Mudança de título para: "Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria têxtil e dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Blue 291 em medula óssea de camundongos e cólon de ratos"

Ao final do projeto é necessário apresentar o Relatório Final de Atividades.

Atenciosamente,

Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA

Botucatu, 08 de Julho de 2015

GF. 30/2015-CEP

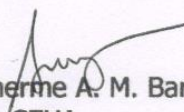
Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Em relação ao Projeto: **(Protocolo CEUA 1002-2013)** Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria têxtil e do corante Disperse Red 1 em medula óssea de camundongos e cólon de ratos, conduzido por Fábio Enrique Fernandes, orientado por Vossa Senhoria, informo que foram **AUTORIZADAS** as mudanças propostas, a partir de 08/07/2015, conforme segue:

- **Método de Eutanásia:**
 - Anterior: Pentobarbital sódico
 - Atual: Deslocamento cervical
- **Adicional de animais:** Foram incluídos 56 camundongos, provenientes da ANILAB.
- **Novo título:** "Potencial toxicogenômico e carcinogênico de efluentes da indústria têxtil e dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Blue 291 em medula óssea de camundongos e cólon de ratos"

Ao final do projeto deve ser apresentado o "**Relatório Final de Atividades**" a CEUA.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Guilherme A. M. Barros
Presidente da CEUA

ANEXO IV

Nomenclatura e informações complementares das sondas (PAMM-003Z, SABiosciences/Qiagen) utilizadas para a avaliação toxicogenômica do corante *Disperse Red 1* no fígado de camundongos

Lista de Genes – PCR array (PAMM-003Z)

Símbolo Oficial	Nome do Gene	RefSeq	Outros símbolos
<i>ADM</i>	<i>Adrenomedullin</i>	NM_009627	<i>AM</i>
<i>AKR1B3</i>	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)</i>	NM_009658	<i>ALR2, AR, AHR-1, AHR1, AKR1B1, ALDOR1, ALDR1</i>
<i>AQP1</i>	<i>Aquaporin 1</i>	NM_007472	<i>CHIP28</i>
<i>AQP2</i>	<i>Aquaporin 2</i>	NM_009699	<i>AQP-CD, WCH-CD, CPH, JPK</i>
<i>AQP4</i>	<i>Aquaporin 4</i>	NM_009700	<i>WCH4</i>
<i>ARNT</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>	NM_009709	<i>D3ERTD557E, DRNT, ESTM42, HIF1B, W08714, BHLHE2, MKIAA4051</i>
<i>ATF4</i>	<i>Activating transcription factor 4</i>	NM_009716	<i>ATF-4, C, ATF, CREB2, TAXREB67</i>
<i>ATF6</i>	<i>Activating transcription factor 6</i>	NM_001081304	<i>9I30025P16RIK, 9630036G24, AA789574, ATF6ALPHA, ESTM49</i>
<i>ATF6B</i>	<i>Activating transcription factor 6 beta</i>	NM_017406	<i>AA617266, ATF6BETA, CREB-RP, CREBL1</i>
<i>ATG12</i>	<i>Autophagy-related 12 (yeast)</i>	NM_026217	<i>4931423H11RIK, A330058M13RIK, APG12L, ATG12L</i>
<i>ATG5</i>	<i>Autophagy-related 5 (yeast)</i>	NM_053069	<i>2010107M05RIK, 3110067M24RIK, AW319544, APG5L, ATG5L, C88337, PADDY</i>

<i>ATG7</i>	<i>Autophagy-related 7 (yeast)</i>	NM_028835	<i>I810013K23RIK, AGP7, APG7L, ATG7L, GM21553</i>
<i>ATM</i>	<i>Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)</i>	NM_007499	<i>AI256621, C030026E19RIK</i>
<i>ATR</i>	<i>Ataxia telangiectasia and rad3 related</i>	NM_019864	-
<i>BECN1</i>	<i>Beclin 1, autophagy related</i>	NM_019584	<i>4921513J16RIK, 5430417M23RIK, ATG6</i>
<i>BID</i>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	NM_007544	<i>2700049M22RIK, AI875481, AU022477</i>
<i>BNIP3L</i>	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like</i>	NM_009761	<i>C86132, D14ERTD719E, NIP3L, NIX</i>
<i>CALR</i>	<i>Calreticulin</i>	NM_007591	<i>CRT, CALREGULIN</i>
<i>CAR9</i>	<i>Carbonic anhydrase 9</i>	NM_139305	<i>CAIX, CA9, MN, CA9</i>
<i>CASP1</i>	<i>Caspase 1</i>	NM_009807	<i>ICE, IL1BC</i>
<i>CCL12</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 12</i>	NM_011331	<i>MCP-5, SCYA12</i>
<i>CD40LG</i>	<i>CD40 ligand</i>	NM_011616	<i>CD154, CD40-L, CD40L, HIGM1, IGM, IMD3, LY-62, LY62, T-BAM, TRAP, TNFSF5, GP39</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)</i>	NM_007669	<i>CAP20, CDKI, CIP1, CDKN1, P21, SDI1, WAF1, MDA6, P21CIP1, P21WAF</i>
<i>CFTR</i>	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog</i>	NM_021050	<i>AW495489, ABCC7</i>
<i>CHEK1</i>	<i>Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)</i>	NM_007691	<i>C85740, CHK1, RAD27</i>
<i>CHEK2</i>	<i>CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)</i>	NM_016681	<i>CHK2, CDS1, HUCDS1, RAD53</i>

<i>CRP</i>	<i>C-reactive protein, pentraxin-related</i>	NM_007768	AI255847
<i>DDB2</i>	<i>Damage specific DNA binding protein 2</i>	NM_028119	2610043A19RIK
<i>DDIT3</i>	<i>DNA-damage inducible transcript 3</i>	NM_007837	<i>CHOP-10, CHOP10, CHOP, GADD153</i>
<i>DNAJC3</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</i>	NM_008929	AA408985, AU067833, <i>DNAJC3A, DNAJC3B, PRKRI, MP58, P58, P58IPK</i>
<i>EDN1</i>	<i>Endothelin 1</i>	NM_010104	<i>ET-1, PREPROET</i>
<i>EPO</i>	<i>Erythropoietin</i>	NM_007942	-
<i>FAS</i>	<i>Fas (TNF receptor superfamily member 6)</i>	NM_007987	AI196731, <i>APO1, APT1, CD95, TNFR6, TNFRSF6, LPR</i>
<i>FTH1</i>	<i>Ferritin heavy chain 1</i>	NM_010239	<i>FHC, FTH, HFT, MFH</i>
<i>GADD45A</i>	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</i>	NM_007836	AA545191, <i>DDIT1, GADD45</i>
<i>GADD45G</i>	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma</i>	NM_011817	AI327420, <i>C86281, CR6, DDIT2, OIG37</i>
<i>GCLC</i>	<i>Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit</i>	NM_010295	<i>D9WSU168E, GLCL-H, GGCS-HS, GLCLC</i>
<i>GCLM</i>	<i>Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit</i>	NM_008129	AI649393, <i>GCMC, GLCLR</i>
<i>GRB2</i>	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>	NM_008163	AA408164, <i>ASH</i>
<i>GSR</i>	<i>Glutathione reductase</i>	NM_010344	AI325518, <i>GR-1, GRI,</i>
<i>GSTP1</i>	<i>Glutathione S-transferase, pi 1</i>	NM_013541	<i>GSTPIB</i>
<i>HMOX1</i>	<i>Heme oxygenase (decycling) 1</i>	NM_010442	<i>D8WSU38E, HO-1, HO1, HEMOX, HMOX, HSP32</i>

<i>HSP90AA1</i>	<i>Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1</i>	NM_010480	86KDA,89KDA,AL024080, AL024147, HSP86-1, HSP89, HSP90, HSPCA, HSP4
<i>HSP90B1</i>	<i>Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1</i>	NM_011631	ERP99, GRP94, TA-3, TARG2, TRA-1, TRAI, ENDOPLASMIN, GP96
<i>HSPA4</i>	<i>Heat shock protein 4</i>	NM_008300	70KDA, AI317151, APG-2, HSP110, HSP70RY, MKIAA4025
<i>HSPA4L</i>	<i>Heat shock protein 4 like</i>	NM_011020	94KDA, AI461691, APG-1, OSP94
<i>HSPA5</i>	<i>Heat shock protein 5</i>	NM_022310	AL022860, AU019543, BIP, D2WSU141E, D2WSU17E, GRP78, HSCE70, SEZ-7, SEZ7, BAFFLED, MBIP
<i>HUS1</i>	<i>Hus1 homolog (S. pombe)</i>	NM_008316	-
<i>IFNG</i>	<i>Interferon gamma</i>	NM_008337	IFN-G, IFG
<i>IL1A</i>	<i>Interleukin 1 alpha</i>	NM_010554	IL-1A
<i>IL1B</i>	<i>Interleukin 1 beta</i>	NM_008361	IL-1BETA, IL-1B
<i>IL6</i>	<i>Interleukin 6</i>	NM_031168	IL-6
<i>LDHA</i>	<i>Lactate dehydrogenase A</i>	NM_010699	LDH1, LDHM, L7R2
<i>MCL1</i>	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>	NM_008562	AW556805, MCL-1
<i>MMP9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	NM_013599	AW743869, B, MMP9, CLG4B, MMP-9, PRO-MMP-9
<i>MRE11A</i>	<i>Meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i>	NM_018736	MRE11, MRE11B
<i>NBN</i>	<i>Nibrin</i>	NM_013752	NBS1

<i>NFAT5</i>	<i>Nuclear factor of activated T-cells 5</i>	NM_018823	<i>AI225870, B130038B15RIK, CAG8, CAG80, NFATL1, OREBP, TONEBP, MKIAA0827, NFATZ</i>
<i>NQO1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>	NM_008706	<i>AV001255, DIA4, DTD, NMO-1, NMO1, NMOR1, OX-1, OX1, QRI</i>
<i>PARP1</i>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1</i>	NM_007415	<i>5830444G22RIK, AI893648, ARTD1, ADPRP, ADPRT1, C80510, PARP, PPOL, PARP-1, SPARP-1</i>
<i>PRDX1</i>	<i>Peroxiredoxin 1</i>	NM_011034	<i>MSP23, NKEFA, OSF-3, OSF3, PAG, PAGA, PRDX1, PRXI, TDX2, TPXA, TDPX2, PRX1</i>
<i>PVR</i>	<i>Poliovirus receptor</i>	NM_027514	<i>3830421F03RIK, CD155, D7ERTD458E, HVED, PVS, TAA1, TAGE4, ME4, NECL-5</i>
<i>RAD17</i>	<i>RAD17 homolog (S. pombe)</i>	NM_011233	<i>MMRAD24</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 homolog (S. cerevisiae)</i>	NM_011234	<i>AV304093, RAD51A, RECA</i>
<i>RAD9A</i>	<i>RAD9 homolog (S. pombe)</i>	NM_011237	<i>RAD9</i>
<i>RIPK1</i>	<i>Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>	NM_009068	<i>D330015H01RIK, RIP, RINP, RIP1</i>
<i>RIPK3</i>	<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 3</i>	NM_019955	<i>2610528K09RIK, AW107945, RIP3</i>
<i>SERPINE1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1</i>	NM_008871	<i>PAI-1, PAI1, PLANH1</i>

<i>SLC2A1</i>	<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1</i>	NM_011400	<i>GLUT-1, GLUT1</i>
<i>SLC5A3</i>	<i>Solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3</i>	NM_017391	<i>AA623876, BF642829, SMIT1</i>
<i>SLC9A3</i>	<i>Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3</i>	NM_001081060	<i>9030624O13RIK, AI930210, NHE-3, NHE3</i>
<i>SQSTM1</i>	<i>Sequestosome 1</i>	NM_011018	<i>A170, OSF-6, OSI, STAP, STONE14, P62</i>
<i>TLR4</i>	<i>Toll-like receptor 4</i>	NM_021297	<i>LPS, LY87, RAN, MI, RASL2-8</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	NM_013693	<i>DIF, TNF-A, TNF-ALPHA, TNFSF2, TNFALPHA, TNFA, TNFSF1A</i>
<i>TNFRSF10B</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i>	NM_020275	<i>DR5, KILLER, LY98, MK, TRAILR2, TRICK2A, TRICK2B, TRICKB</i>
<i>TNFRSF1A</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</i>	NM_011609	<i>CD120A, FPF, TNF-R, TNF-R-I, TNF-R1, TNF-R55, TNF-ALPHAR1, TNFAR, TNFR60, TNFRI, TNFRP55, TNFALPHA-R1, TNFR-2, TNFR1, P55, P55-R</i>
<i>TRP53</i>	<i>Transformation related protein 53</i>	NM_011640	<i>TP53, BBL, BFY, BHY, P44, P53</i>
<i>TXN1</i>	<i>Thioredoxin 1</i>	NM_011660	<i>ADF, AW550880, TRX1, TXN</i>
<i>TXNL4B</i>	<i>Thioredoxin-like 4B</i>	NM_175646	<i>AI595343, DLP, DIM2D530025J19RIK,</i>
<i>TXNRD1</i>	<i>Thioredoxin reductase 1</i>	NM_015762	<i>TR, TR1, TRXR1</i>

<i>ULK1</i>	<i>Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)</i>	NM_009469	<i>AU041434, UNC51.1, MKIAA0722</i>
<i>VEGFA</i>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	NM_009505	<i>VEGF, VPF</i>
<i>XBP1</i>	<i>X-box binding protein 1</i>	NM_013842	<i>D11ERTD39E, TREB-5, TREB5, XBP-1</i>
<i>XPC</i>	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>	NM_009531	-
<i>ACTB</i>	<i>Actin, beta</i>	NM_007393	<i>ACTX, E430023M04RIK, BETA-ACTIN</i>
<i>B2M</i>	<i>Beta-2 microglobulin</i>	NM_009735	<i>LY-M11, BETA2-M, BETA2M</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	NM_008084	<i>GAPD</i>
<i>GUSB</i>	<i>Glucuronidase, beta</i>	NM_010368	<i>AI747421, GUR, GUS, GUS-R, GUS-S, GUS-T, GUS-U, GUT, ASD, G</i>
<i>HSP90AB1</i>	<i>Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1</i>	NM_008302	<i>90KDA, AL022974, C81438, HSP84, HSP84-1, HSP90, HSPCB</i>
<i>MGDC</i>	<i>Mouse Genomic DNA Contamination</i>	SA_00106	<i>MIGX1B</i>
<i>RTC</i>	<i>Reverse Transcription Control</i>	SA_00104	<i>RTC</i>
<i>RTC</i>	<i>Reverse Transcription Control</i>	SA_00104	<i>RTC</i>
<i>RTC</i>	<i>Reverse Transcription Control</i>	SA_00104	<i>RTC</i>
<i>PPC</i>	<i>Positive PCR Control</i>	SA_00103	<i>PPC</i>
<i>PPC</i>	<i>Positive PCR Control</i>	SA_00103	<i>PPC</i>
<i>PPC</i>	<i>Positive PCR Control</i>	SA_00103	<i>PPC</i>