

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/03/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental
2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (*non-Cl* PBTA-9) *in vivo*

Amanda Rodrigues Tanamachi

Botucatu - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental
2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (*non-Cl PBTA-9*) *in vivo*

Amanda Rodrigues Tanamachi

Orientadora: Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientador: Dr. Fábio Henrique Fernandes

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu - SP

2020

T161p

Tanamachi, Amanda Rodrigues

Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental
2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (non-Cl PBTA-9) in vivo /
Amanda Rodrigues Tanamachi. -- Botucatu, 2020

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientadora: Fábio Henrique Fernandes

1. Toxicologia ambiental. 2. Mutagenese. 3. Genética. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Silvana e Eyiji Tanamachi por todo apoio, incentivo, paciência e compreensão da minha ausência em momentos importantes durante esses anos, sem o amor incondicional deles eu não chegaria até onde cheguei. Ao meu irmão Vitor Rodrigues Tanamachi, por todo o amparo, amizade e suporte técnico, que com toda certeza foi fundamental.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, pela oportunidade e confiança depositada. Graças as motivações e ensinamentos, consegui superar obstáculos e continuar a caminhada para me tornar uma pesquisadora.

Ao meu coorientador, Dr. Fábio Henrique Fernandes, pela amizade, incentivo e paciência. Obrigada por me mostrar sempre o lado positivo nos momentos difíceis e pela fiel dedicação, extremamente importante para minha formação.

À MSc. Josiane Aparecida de Souza Vendemiatti (FT–Unicamp) pela primordial colaboração, confiança e por compartilhar seu conhecimento sobre o PBTA-9, assim como o fornecimento do composto-teste.

À Dra. Patrícia Prediger (FT–Unicamp) pela parceria fundamental e por acreditar no potencial da pesquisa.

À Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (FT–Unicamp) pelo apoio ao trabalho e pela contribuição de conhecimento.

À Dra. Noeme Sousa Rocha (FMVZ–Unesp) pela interpretação das análises histopatológicas do fígado e por toda gentil colaboração.

Aos técnicos do biotério do Departamento de Patologia (FMB–Unesp), Paulo César Georgete, José Roberto de Oliveira e Rosangela de Campos, pelo importante apoio e suporte com os animais.

Aos assessores estatísticos do Escritório de Apoio à Pesquisa (FMB–Unesp), Dr. Hélio Rubens de Carvalho Nunes e MSc. Eloisa Elena Paschoalinotte, pelo processamento de dados estatístico dos testes do Cometa e Micronúcleo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado pelo processo n° 2018/04105-5.

Ao Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos (INCT-DATREM) pelo incentivo financeiro concedido pela chamada INCT – MCTI/ CNPq/CAPES/FAPs n° 16/2014.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) da Unesp – Botucatu, em especial ao Supervisor Técnico da Seção de Pós-Graduação Davi Barcellos de Oliveira Müller por sempre sanar minhas dúvidas com competência e agilidade.

Aos meus colegas, membros do Laboratório de Toxicogenômica & Nutrigenômica (OMICS) e do Laboratório Genotox, Dr. André Luiz Ventura Sávio, Dr. Leonardo da Cunha Menezes Souza, Dra. Juliana Lara, Phillipe Franklin Coelho Magalhães e Kamilla Leme, por todo companheirismo e valiosa amizade, além da extrema cooperação com o trabalho. Agradeço muito pelos ensinamentos, afetos e carinhos, imensamente importantes para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

E a todos meus familiares e amigos que de alguma forma me proporcionaram força, tranquilidade e sabedoria para meu crescimento e a realização deste estudo.

Muito Obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Sumário

Índice de Tabelas	I
Índice de Figuras	II
Lista de Abreviaturas e Siglas	III
Resumo	IV
Abstract.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1. Poluição ambiental e efluentes têxteis.....	8
2.2. Corantes azo e a formação de non-Cl PBTAs	9
2.3 Atividade mutagênica de corantes azo e seus derivados	13
2.4 Testes para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade.....	15
2.5. Modulação gênica e a gênese de doenças.....	19
3. HIPÓTESE DO ESTUDO.....	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Geral	22
4.2 Específicos.....	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1. Animais.....	23
5.2 Composto-teste	23
5.3 Delineamento experimental	24
5.4 Teste do micronúcleo.....	25
5.5 Teste do cometa	26
5.5.1 Obtenção de células	26
5.5.2 Preparação de lâminas, eletroforese e análise microscópica	27
5.6 Análise de expressão gênica em células hepáticas	29
5.6.1 Extração e quantificação de RNA	29
5.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT).....	29
5.7 Análise histopatológica	30

6. RESULTADOS	32
6.1 Teste do micronúcleo.....	32
6.2 Teste do cometa	33
6.3 Análise de expressão gênica	34
6.4 Histologia do fígado	35
7. DISCUSSÃO	36
8. CONCLUSÃO.....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
10. ANEXO I.....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estrutura e nome químico de oito tipos de 2-fenilbenzotriazóis não clorados (<i>non</i> -Cl PBTA) descritos na literatura (modificado de Carmazen, 2007; Kummrow & Umbuzeiro, 2008).....	11
Tabela 2: Bateria de testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> recomendada pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) para avaliação de potencial toxicogenético	16
Tabela 3: Nomenclatura e informações complementares das sondas utilizadas na avaliação toxicogenômica do <i>non</i> -Cl PBTA-9	30
Tabela 4: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos tratados com o <i>non</i> -Cl PBTA-9	32

Índice de Figuras

Figura 1. Via simplificada de síntese dos 2-fenilbenzotriazóis não clorados (non-Cl PBTA) a partir de um corante azoico (modificado de Carmazen, 2007).....	10
Figura 2. Estrutura química do PBTA-9 não clorado.....	12
Figura 3. Fotomicrografia de células submetidas a eletroforese (teste do cometa). (A) Nucleóide íntegro – cabeça; (B) nucleóide e a cauda formada por fragmentos de DNA, conferindo aspecto de cometa.....	18
Figura 4. Esquema mostrando o processo de divisão eritrocitária e formação de micronúcleos em medula óssea de roedores. (A) Dano de origem clastogênica; (B) dano de origem aneugênica. Adaptado de MutaGen – Brasil; www.youtube.com/watch?v=rFO7Mn4O1As..	18
Figura 5. Fotomicrografia de esfregaço de medula óssea de camundongo. A; eritrócito policromático. B; eritrócito normocromático. C; eritrócito policromático micronucleado. Coloração Giemsa; aumento de 1000x.....	26
Figura 6. Fotomicrografia de células sanguíneas de camundongos coradas com solução aquosa de SYBR Gold (1:9999). (A) Quantificação da porcentagem de DNA fragmentado na cauda do nucleóide (% tail intensity) pelo software Comet Assay IV. Aumento de 400x; *nucleóides.....	28
Figura 7. Danos no DNA (tail intensity) de células do sangue periférico, fígado e cólon de camundongos tratados com o <i>non-Cl</i> PBTA-9. Controle positivo (MNU 50 mg/kg p.c.); controle negativo – água filtrada; controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO); * $p < 0,001$ em relação ao controle do veículo (DMSO).....	33
Figura 8. Expressão relativa de RNAm <i>NAT2</i> , <i>TRP53</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>CDKN1A</i> em células hepáticas de camundongos tratados com <i>non-Cl</i> PBTA-9 (5, 50 e 500µg/kg p.c.). Controle negativo (água filtrada); controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO).	34
Figura 9. Fotomicrografias de fígado de camundongos. A – controle positivo; B – controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO); C – grupo tratado com 5µg/kg do <i>non-Cl</i> PBTA-9; D – grupo tratado com 50µg/kg p.c. do <i>non-Cl</i> PBTA-9; E – grupo tratado com 500µg/kg p.c. do <i>non-Cl</i> PBTA-9. As setas indicam células binucleadas. Coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400x.....	35

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BDCP	<i>Black Dye Commercial Product</i>
CI	<i>Color index</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (P21)</i>
CYP1A1	<i>Cytochrome P450, Family 1, Subfamily A, Polypeptide 1</i>
CYP450	<i>Cytochromes P450</i>
DB291	<i>Disperse Blue 291</i>
DB373	<i>Disperse Blue 373</i>
DMSO	<i>Dimetilssulfóxido</i>
DO37	<i>Disperse Orange 37</i>
DR1	<i>Disperse Red 1</i>
DV93	<i>Disperse Violet 93</i>
ETA	<i>Estação de tratamento de Água</i>
IDN	<i>Índice de Divisão Nuclear</i>
IPBC	<i>Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese</i>
MNU	<i>N-methyl-N-nitrosourea</i>
NAT2	<i>N-acetyltransferase 2</i>
NCE	<i>Eritrócitos normocromáticos (do inglês <i>normochromatic erythrocytes</i>)</i>
Non-Cl PBTA-9	<i>2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (do inglês <i>2-phenylbenzotriazole non chlorinated</i>)</i>
OECD	<i>Organization Economic Co-operation and Development</i>
PBTA	<i>2-fenilbenzotriazol (do inglês <i>2-phenylbenzotriazole</i>)</i>
PCE	<i>Eritrócitos policromáticos (do inglês <i>polychromatic erythrocytes</i>)</i>
PCEMN	<i>Eritrócitos policromáticos micronucleados</i>
TRP53	<i>Transformation Related Protein 53</i>
µg	<i>Micrograma</i>
µL	<i>Microlitro</i>

Resumo

O setor industrial, em constante expansão, gera, diariamente, resíduos com elevado potencial tóxico ao ambiente. Nesse contexto, a indústria têxtil apresenta grande impacto poluidor para a hidrosfera, devido aos compostos e processos químicos utilizados na coloração de tecidos. A literatura mostra que não há eficiência na remoção desses compostos, tanto por parte das fábricas, como em Estações de Tratamento de Água (ETAs) para o abastecimento humano. Pelo contrário, o processo de descontaminação pode tornar corantes do grupo azo, por exemplo, ainda mais tóxicos. Portanto, a poluição ambiental por essa classe de corantes vem sendo alvo de inúmeros estudos para a caracterização química e toxicológica, sobretudo dos subprodutos e intermediários gerados, dentre os quais os 2-fenilbenzotriazolóis não clorados (*non-Cl* PBTA). Dentre eles, o *non-Cl* PBTA-9 tem recebido especial atenção por ser derivado do corante Disperse Violet 93, que tem sido detectado em maior quantidade nos corpos fluviais sob influência de atividades têxteis. Com base nesse cenário, o presente estudo objetivou investigar o potencial toxicogenômico do *non-Cl* PBTA-9 em camundongos. Foram testadas três concentrações do composto, 5, 50 e 500 µg/kg p.c., administradas aos animais por via gástrica (*gavage*) em dose única. Foram analisadas as frequências de micronúcleo em células de medula óssea, o nível de danos primários no DNA em células do sangue, fígado e cólon, além do padrão de expressão dos genes *TP53*, *CYP1A1*, *NAT2* e *CDKN1A* e histologia do fígado. Os resultados mostraram que o *non-Cl* PBTA-9 apresentou efeito genotóxico em células do sangue periférico e do fígado na dose de 500 µg/kg p.c, além de ser genotóxico nas doses de 5, 50 e 500 µg/kg em células do cólon. O efeito mutagênico em células da medula óssea foi observado apenas nas doses de 5 e 50 µg/kg p.c e não foi encontrada nenhuma alteração histológica e na expressão gênica no fígado. Diante desses achados pode-se concluir que o *non-Cl*-PBTA-9, subproduto do corante azo DV93, mesmo em baixas concentrações, foi genotóxico e mutagênico, sugerindo que a contaminação da água por esse composto pode ser prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana.

Palavras-chaves: *corante têxtil, 2-fenilbenzotriazol, poluição hídrica, mutagênese ambiental*

Abstract

The constantly expanding industrial sector has been generating residues with high toxic potential to the environment. The textile industry has a heavily impact, polluting the hydrosphere due to chemical processes used. Literature shows that even after effluent treatment, toxic compounds are still present in the wastewater and in rivers. Moreover, the water decontamination can make some dyes compounds even more toxics. Currently, environmental pollution caused by azo dyes, their byproducts and intermediates, has been widely investigated. In this sense, the non-chlorinated 2-phenylbenzotriazole 9 (*non-Cl* PBTA 9) has received attention because it is derived from the dye Disperse Violet 93, which is detected in high quantity in surface waters under influence of textile activities. Thus, the aim of this study was to investigate the toxicogenomic potential of acute exposure to the non-chlorinated PBTA-9 in mice. The three doses tested (5, 50 and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) of the compound were orally (gavage) administered to the animals. Micronucleus frequency in bone marrow cells, primary DNA damage in blood, liver and colon cells, and gene (*TP53*, *CYP1A1*, *NAT2* and *CDKN1A*) expression profiling in liver cells were analyzed. The results showed that the *non-Cl* PBTA 9 was genotoxic in blood and liver cells at the highest dose (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.) and at doses of 5, 50 and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. in colon cells. Mutagenic effect in bone marrow cells was observed at 5 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.. No histological alterations and gene expression modulation were detected in liver. In conclusion, the data showed that the *non-Cl* PBTA 9, byproduct of DV93, even at low concentrations, presented a genotoxic potential, suggesting that water contamination by this compound may be harmful to the environment and human health.

Keywords: Environmental Mutagenesis, 2-phenylbenzotriazole, Textile Dye, Water Pollution

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

Ao contrário do que se pensava no passado, os recursos hídricos são limitados, sobretudo no que se refere a água para o consumo humano (Ghaly et al., 2013). O aumento e o uso irracional da atividade industrial fazem com que a poluição dos recursos hídricos seja um dos maiores e mais relevantes problemas do mundo moderno. A utilização inadequada da água resulta em impactos para o meio ambiente, como o acúmulo de substâncias tóxicas, eutrofização, poluição térmica, entre outros, cujas agressões podem se tornar irreversíveis (Subtil et al., 2014).

Estudos recentes demonstram que, em alguns casos, o problema da contaminação de recursos hídricos piorou no decorrer dos anos. De 1998 a 2008, foram coletadas 1.720 amostras de água de diferentes rios do Estado de São Paulo, e as análises mostraram que 20% apresentavam potencial mutagênico detectado pelo teste de *Salmonella*/Microsoma (Teste de Ames). Nos períodos de 1999 a 2003 e 2011 a 2015, utilizando o mesmo teste, foram analisadas amostras 33 locais e observado aumento da mutagenicidade. Esse fato, de acordo com os autores, provavelmente causado pelo aumento de atividade industrial (foram registradas 7.000 novas licenças de funcionamento por ano), além do crescimento populacional. Importante destacar que nesse estudo os pesquisadores selecionaram os locais de coleta de acordo com o destino que se dava à água do rio, dando preferência a rios cuja água era utilizada para consumo humano (como água para beber, recreação e banho) e navegação (Roubicek et al., 2020).

O lançamento de efluentes industriais é a forma mais comum de contaminação de corpos fluviais, uma vez que normalmente não são utilizados processos de produção completamente limpos. Nesse sentido, o setor têxtil brasileiro, que hoje representa 2,6% da produção mundial, contribui consideravelmente para a geração de grandes quantidades de

poluentes ambientais (Amaral et al., 2018). Os efluentes das indústrias têxteis são caracterizados por possuírem elevada complexidade, contendo inúmeros compostos comprovadamente mutagênicos (metais pesados, surfactantes, subprodutos de processamentos, corantes dispersos da classe azo, entre outros) (Schmidt, 2018). Recentemente, estudo realizado por Vendemiatti *et al.* (2017) mostrou que o tratamento inadequado dos efluentes pode produzir reações oxidativas e/ou redutivas envolvendo os corantes da classe azo e gerar subprodutos ainda mais tóxicos.

No campo do monitoramento ambiental existe a busca constante por condições adequadas à manutenção dos ecossistemas e da saúde humana. Assim, a área de Mutagênese Ambiental tornou-se de extrema relevância, pois produz conhecimentos sobre o perigo genético da exposição às mais variadas classes de poluentes. Embora os organismos vivos possuam sistemas de defesa bastante eficientes, a identificação de compostos mutagênicos e de situações de exposição a esses agentes pode evitar ou reduzir a chance do desenvolvimento de diversas doenças, entre as quais o câncer. Hoje, são inúmeras as ferramentas que permitem detectar atividades mutagênicas utilizando-se diferentes sistemas-teste e protocolos de pesquisa. É possível, por exemplo, identificar mutágenos presentes no ar, solo e água, além dos seus respectivos mecanismos de ação genotóxica.

Dentro do contexto apresentado, vários países têm direcionado esforços no sentido de aprimorar as estratégias de monitoramento ambiental e formar massa crítica para avaliações de risco e implementação de soluções para as situações adversas.

8. CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir de camundongos após exposição aguda ao *non-Cl* PBTA-9 permitiram concluir que esse composto:

I - induz danos primários no DNA de células do cólon em todas as doses testadas (5, 50 e 500 µg/kg p.c.) e em células hepáticas e sanguíneas na dose mais alta (500 µg/kg p.c.);

II - apresenta efeito mutagênico nas doses 5 e 50 µg/kg p.c. em células da medula óssea;

III - não altera a expressão dos genes *NAT2*, *CYP1A1*, *CDKN1A* e *TRP53* em células hepáticas;

IV - não promove alterações histológicas no fígado.

Em linhas gerais, a exposição ao *non-Cl* PBTA-9 *in vivo* é capaz de promover danos no material genético (atividade genotóxica e mutagênica). Os dados, inéditos, mostram o perigo da exposição ao composto e contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos de ação dessa classe de poluente ambiental. Adicionalmente, os resultados poderão subsidiar políticas públicas para o descarte e tratamento de efluentes gerados pela indústria têxtil.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves de Lima RO, Bazo AP, Salvadori DMF, Rech CM, de Palma Oliveira D, de Aragão Umbuzeiro G. 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.

Amaral MC do, Zonatti WF, Silva KL da, Karam Junior D, Amato Neto J, Baruque-Ramos J. 2018. Industrial textile recycling and reuse in Brazil: case study and considerations concerning the circular economy. *Gest Produção*. 25:431–443.

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

Burlinson B. 2012. The In Vitro and In Vivo Comet Assays. In: *Methods Mol Biol* Clifton NJ. *Genet Toxicol*. 817:143–163.

Carmazen, PCV. 2007. Investigação de lesões em DNA induzidas por produtos de redução do corante C. I. Disperse Blue 291. Master's Dissertation, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/D.9.2007.tde-25102007-151610.

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.

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.

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.

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.

Edwards, CA. 1993. Anatomical and physiological basis: physiological factors influencing drug absorption: Colonic drug absorption and metabolism. *Drug Pharm Sci*. 60:1-28.

Erber R, Klein W, Andl T, Enders C, Born AI, Conradt C, Bartek J, Bosch FX. 1997. Aberrant p21CIP1/WAF1 protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer*. 74:383–389.

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:S5–S24.

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.

Fernandes FH, Botasso-Nasciutti MO, Svio ALV, Souza L da CM, Fernandes-Cal JR, Cardoso FF, Fontes MR de M, Albuquerque AF, Munari CC, Kummrow F, et al. 2018. *In Vivo* genotoxicity of a commercial C.I. Disperse Red 1 dye: Genetic Hazard of Commercial Disperse Red 1. *Environ Mol Mutagen*. 59:822–828.

Fernandes FH, Umbuzeiro G de A, Salvadori DMF. 2019. Genotoxicity of textile dye C.I. Disperse Blue 291 in mouse bone marrow. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 837:48–51.

Freire AC, Podczech F, Sousa J, Veiga F. 2006. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. *Rev Bras Ciênc Farm*. 42:319–335.

Gartel AL, Tyner AL. 2002. The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 1:639-649.

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; 247–279.

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

Ghaly AE, Ananthashankar R, Alhattab M, Ramakrishnan VV. 2013. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. *J Chem Eng Process Technol*. 05:182. doi: 10.4172/2157-7048.1000182.

Jiang M, Shao Z-M, Wu J, Lu J-S, Yu L-M, Yuan J-D, Han Q-X, Shen Z-Z, Fontana JA. 1997. p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. *Int J Cancer*. 74:529–534.

Kummrow F, Umbuzeiro GA. 2008. 2-fenilbenzotriazóis (PBTA): uma nova classe de contaminantes ambientais. *Quím Nova*. 31:401–406.

Kunz A, Peralta-Zamora P, Moraes SG de, Durán N. 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Quím Nova*. 25:78–82.

Levine AJ. 1997. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 88:323–331.

Masuda S, Deguchi Y, Masuda Y, Watanabe T, Nukaya H, Terao Y, Takamura T, Wakabayashi K, Kinae N. 2004. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole

(PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 560:33–40.

Matsuoka A, Sakamoto H, Tadokoro S, Tada A, Terao Y, Nukaya H, Wakabayashi K. 2000. The 2-phenylbenzotriazole-type water pollutant PBTA-2 has cytochalasin B-mimetic activity. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 464:161–167.

Matsuoka A, Tada A, Terao Y, Nukaya H, Önfelt A, Wakabayashi K. 2001. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (AZO DYES) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 493:75–85.

Ulecia MK, Carey MD. 2018. Interactions of 2-phenyl-benzotriazole xenobiotic compounds with human Cytochrome P450-CYP1A1 by means of docking, molecular dynamics simulations and MM-GBSA calculations. *Comput Biol Chem*. 74:253–262.

Nukaya H, Shiozawa T, Tada A, Terao Y, Ohe T, Watanabe T, Asanoma M, Sawanishi H, Katsuhara T, Sugimura T, Wakabayashi K. 2001. Identification of 2-[2-(acetylamino)-4-amino-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 492:73–80.

Oda Y, Watanabe T, Terao Y, Nukaya H, Wakabayashi K. 2008. Genotoxic activation of 2-phenylbenzotriazole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and N-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium* umu strains. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 654:52–57.

OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development 2014. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development. Available from: <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264224292-en>.

OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. Genetic Toxicology Guidance Document: Second Commenting Round. Nov 30, 2015. <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft%20Guidance%20Document%20on%20OECD%20Genetic%20Toxicology%20Test%20Guidelines.pdf>.

Ohe T, Shaughnessy DT, Landi S, Terao Y, Sawanishi H, Nukaya H, Wakabayashi K, DeMarini DM. 1999. Mutation spectra in *Salmonella* TA98, TA100, and TA104 of two phenylbenzotriazole mutagens PBTA-1 and PBTA-2 detected in the Nishitakase River in Kyoto, Japan. 107:701-704.

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res*. 567:109–149.

Oliveira DP, Carneiro PA, Rech CM, Zanoni MVB, Claxton LD, Umbuzeiro GA. 2006. Mutagenic compounds generated from the chlorination of disperse azo-dyes and their presence in drinking water. *Environ Sci Technol*. 40:6682–6689.

- Rauf MA, Salman Ashraf S. 2012. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chem Eng J.* 209:520–530.
- 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.* 26:22.
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Curr Microbiol.* 38:27–32.
- Roubicek DA, Rech CM, Umbuzeiro GA. 2020. Mutagenicity as a parameter in surface water monitoring programs—opportunity for water quality improvement. *Environ Mol Mutagen.* 61:200–211.
- Schmidt C. 2018. Isolamento E Caracterização De Bactérias Eficientes Na Biodegradação De Corantes Azo Sintéticos. Dissertação (Mestrado), Curso de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado. <http://hdl.handle.net/10737/2163>.
- Shiozawa T, Suyama K, Nakano K, Nukaya H, Sawanishi H, Oguri A, Wakabayashi K, Terao Y. 1999. Mutagenic activity of 2-phenylbenzotriazole derivatives related to a mutagen, PBTA-1, in river water. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 442:105–111.
- Shiozawa T, Tada A, Nukaya H, Watanabe T, Takahashi Y, Asanoma M, Ohe T, Sawanishi H, Katsuhara T, Sugimura T, et al. 2000. Isolation and Identification of a New 2-Phenylbenzotriazole-Type Mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi, Japan. *Chem Res Toxicol.* 13:535–540.
- Subtil EL, Mierzwa JC, Hespanhol I. 2014. Comparison between a conventional membrane bioreactor (C-MBR) and a biofilm membrane bioreactor (BF-MBR) for domestic wastewater treatment. *Braz J Chem Eng.* 31:683–691.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35:206–221.
- 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.
- Umbuzeiro GA, Freeman HS, Warren SH, de Oliveira DP, Terao Y, Watanabe T, Claxton LD. 2005. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere.* 60:55–64.
- Umbuzeiro GA, Coimbra CA, Kummrow F, Lobo DJA, Saldiva PHN. 2007. Mutagenic activity assessment of Cristais River, São Paulo, Brazil, using the blue rayon/Salmonella microsome and the *Tradescantia pallida* micronuclei assays. *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2:163–171.
- Vacchi FI, Vendemiatti JA de S, da Silva BF, Zanoni MVB, Umbuzeiro G de A. 2017. Quantifying the contribution of dyes to the mutagenicity of waters under the influence of textile activities. *Sci Total Environ.* 601–602:230–236.

Vendemiatti JA de S, Moralles DA, Camparotto N, Umbuzeiro GA, Prediger P. 2017. Dinitrophenylazo Dye Derivatives: Synthesis, Characterization and Mutagenicity Evaluation. 18th International Symposium on Toxicity Assessment. Limeira, SP, Brasil. 2:30-33.

Wang XW, Harris CC. 1997. p53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol.* 173:247-255.

Watanabe T. 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.

Watanabe T, Nukaya H, Terao Y, Takahashi Y, Tada A, Takamura T, Sawanishi H, Ohe T, Hirayama T, Sugimura T, Wakabayashi K. 2001. Synthesis of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in river water from Japan. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 498:107–115.

Watanabe T, Ohba H, Asanoma M, Hasei T, Takamura T, Terao Y, Shiozawa T, Hirayama T, Wakabayashi K, Nukaya H. 2006. Isolation and identification of non-chlorinated phenylbenzotriazole (non-CIPBTA)-type mutagens in the Ho River in Shizuoka Prefecture, Japan. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 609:137–145.

Wormhoudt LW, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. 1999. Genetic Polymorphisms of Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione-S-Transferase, and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 29:59–124.

Yeganeh M, Gui Y, Kandhi R, Bobbala D, Tobelaim W-S, Saucier C, Yoshimura A, Ferbeyre G, Ramanathan S, Ilangumaran S. 2016. Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic functions of p21CIP1/WAF1 in the liver. *Oncogene.* 35:4200–4211.

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.