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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO AZOCORANTE ACID RED 114
ANTES E APÓS PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO POR MEIO DE UM
CONSÓRCIO DE MICRORGANISMOS**

NÁDIA ALINE CORROQUÉ

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

**Rio Claro - SP
2014**

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO AZOCORANTE ACID RED 114 ANTES
E APÓS PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO POR MEIO DE UM
CONSÓRCIO DE MICRORGANISMOS**

NÁDIA ALINE CORROQUÉ

**ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Renato Corso**

Texto apresentado ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Dedico este trabalho aos meus pais, Daniel e Angela,
e ao meu irmão Marcelo,
por todo o amor e apoio nas minhas decisões

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Daniel e Angela, por todo o amor e incentivo em todos esses anos da minha vida. Também agradeço pela compreensão nos momentos difíceis desta etapa e por entenderem a minha ausência por muitas vezes necessária. Vocês foram e são muito importantes para mim, pois sem vocês ao meu lado, não teria conseguido vencer tantos obstáculos.

Ao meu irmão Marcelo, com quem posso contar sempre e também desabafar todas as minhas dúvidas e desesperos, e por estar sempre tão presente em minha vida. À minha cunhadinha Mi, que com seu jeitinho doido de ser, sempre me faz rir e descontrair um pouco. Aos meus sobrinhos queridos, Léo e Bia, é sempre muito bom poder ver o sorriso de vocês e com isso, fazer com que qualquer problema num passe de mágica desapareça.

Ao meu namorado Rafa, por todo o companheirismo, compreensão e carinho, principalmente nas horas mais difíceis. Obrigada por sempre me ajudar a ver as saídas e por não me deixar desistir nunca. Você é pra mim um grande exemplo de força, do qual sempre me inspiro.

À minha orientadora Marin, não só por este trabalho, mas por todos esses anos de orientação. Obrigada pela paciência, atenção, confiança e acima de tudo, amizade. Esse mestrado foi bem carregado, mas agradeço muito por você estar ao meu lado e me ajudar a trabalhar todas as novidades e dificuldades que encontramos. Aprendemos muito, como você mesma diz! Obrigada por mais esta oportunidade e por acreditar em mim.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Carlos Renato Corso, por todo o auxílio no aprendizado das técnicas de espectrofotometria e por sua disponibilidade e atenção para ensinar detalhadamente todos os processos de biodegradação.

À Professora Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, por toda a sua atenção para ensinar as técnicas de isolamento de microrganismos e também por nos ceder seu laboratório, reagentes e equipamentos, imprescindíveis para realização desta etapa do trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Emilio Levy e ao Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas – UNICAMP, por toda a dedicação com nossas amostras, realizando a identificação dos microrganismos presentes nas amostras aqui avaliadas.

Ao pessoal do Laboratório de Toxicidade de Águas, por me auxiliarem na confecção dos meios e no aprendizado das técnicas microbiológicas. Não irei citar nomes para não correr o risco de ser injusta e me esquecer de alguém. Em especial, agradeço às técnicas Luiza e Inês,

por todo o carinho ao me receber no laboratório e me ensinar o desenvolvimento das técnicas, mesmo na turbulência de outros ensaios.

Ao Beto, técnico da Bioquímica, por sua atenção e disponibilidade para me ajudar no preparo das soluções e nas leituras do espectrofotômetro UV-Vis e também por todos os seus ensinamentos sobre química.

À Grazy, por toda a sua paciência e acompanhamento na montagem dos ensaios de biodegradação e nas leituras realizadas no FTIR e UV-Vis. Obrigada por esclarecer minhas dúvidas, que não foram poucas, sempre me atendendo de prontidão.

Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese Ambiental (Bairral, Bruna, Cinthya, Cleitinho, Dânia, Franco, Jana, Jorge, Karol, Laís, Léo, Livia, Marcinha, Maria Tereza, Matheus, Matraca, Michele, Paula, Pulga, Raquel, Thaís, Thays, Verônica e Yali) pelo convívio e incentivo de vocês. Cada um aqui teve uma participação neste trabalho, se não na prática em si, na preocupação do desenvolvimento, nas conversas, conselhos e descontrações.

À dupla que divide comigo os estresses e adversidades do mestrado, Léo e Livia, obrigada pelo convívio e companheirismo de vocês. Muitas vezes pensamos juntos, choramos juntos e agora vamos comemorar juntos essa conquista também.

Às minhas japas do coração, Raquel e Marcinha, por todo o auxílio que me deram na cultura celular, ensinando e me ajudando nas técnicas e também nas análises. Sei que foram dias difíceis, mas muito obrigada pela amizade de vocês.

À Thaís por toda sua dedicação para me ensinar e ajudar no teste de *Salmonella*/microssoma. À Dânia, por também me auxiliar na aprendizagem da técnica, mas principalmente por auxiliar na realização das estatísticas e discussão dos resultados.

Ao grupão de ajuda para as coletas de MN e cometas: Franco, Laís, Marcinha, Maria Tereza, Matheus, Michele, Pulga e Raquel, por serem grandes amigos e sempre estarem dispostos a me ajudar!! Meu mais sincero: muito obrigada!! Não só pelo trabalho, mas também por ajudarem a descontrair os ensaios e tornar o trabalho mais prazeroso.

Ao técnico Gerson, pela sua prontidão e ajuda em todos os momentos necessários. À nossa técnica maluquete, Roberta, por toda a sua dedicação no preparo dos materiais e reagentes, e também muito obrigada pelas ajudas no ensaio de *Salmonella* (te deixei craque no assunto..rs).

À Larissa, grande amiga e que sempre me deu forças em todos os momentos. Obrigada pelas conversas, conselhos, risadas e também pelas caminhadas para relaxar.

À Dani Leme, por seus conselhos, dicas e também por sempre tirar minhas dúvidas, que às vezes surgem aos montes (rs), mesmo estando agora mais distante.

À Fapesp, pelo apoio financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

Enfim, à todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

Se as coisas são inatingíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes seriam os caminhos se não fora
A mágica presença das estrelas”

Das Utopias – Mario Quintana

RESUMO

As indústrias têxteis têm contribuído para a contaminação dos corpos d'água, por descartar seus efluentes no meio ambiente. Essas indústrias utilizam uma grande diversidade de corantes em seus processos de tingimento, dentre eles, os azocorantes. Estes corantes azóicos, pela sua característica molecular de difícil remoção ou degradação, somado ao seu amplo uso, são considerados altamente detrimenais ao ambiente. O corante Acid Red 114, pertencente a classe dos azocorantes, é o agente químico alvo deste trabalho. Este estudo tem como proposta, investigar a possibilidade de degradação por microrganismos isolados do lodo de uma indústria têxtil e avaliar as toxicidades do corante Acid Red 114 e dos subprodutos gerados na sua biodegradação. Para avaliação da toxicidade deste corante, foram considerados os parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade. Para análise da genotoxicidade, foram utilizados o ensaio do cometa em cultura de hepatoma humano (HepG2). Para avaliar o potencial mutagênico, foram realizados os testes do micronúcleo (MN) em cultura de células HepG2 e o teste de *Salmonella*/microsossoma. A comprovação da biodegradação foi feita por meio do método físico-químico de Espectrofotometria UV-Vis e FTIR. De acordo com os resultados obtidos, o corante Acid Red 114 mostrou-se genotóxico e também mutagênico para as células HepG2, mas não mutagênico para *Salmonella typhimurium*. O biodegradado gerado pelas bactérias *Enterococcus faecalis* e *Alcaligenes faecalis* foi genotóxico e mutagênico para a cultura celular HepG2, mas não foi mutagênico no teste com *Salmonella*/microsossoma. O biodegradado gerado pela bactéria *Achromobacter nitridificans* apresentou, em células HepG2, potencial genotóxico, mas não foi mutagênico para HepG2 nem para o teste de *Salmonella*/microsossoma. Estes resultados de toxicidade mostraram que o uso deste corante requer bastante cautela, pois ele pode ter ação adversa nos seres vivos, inclusive no homem, por meio do tratamento inadequado do efluente têxtil ou das estações de tratamentos de água que usam os corpos hídricos que recebem esses efluentes. Também foi observado que os compostos gerados pela biodegradação podem ainda induzir uma alta toxicidade para os organismos vivos.

Palavras chaves: Corantes azóicos. Genotoxicidade. Mutagenicidade. Ensaio do cometa. Teste do micronúcleo. Ensaio de *Salmonella*/microsossoma.

ABSTRACT

Textile industries have contributed to the contamination of water bodies by disposing their effluents into the environment. These industries use a wide variety of dyes in dyeing processes, among them, the azo dyes. These azo dyes due to their molecular characteristics of difficult removal or degradation and their extensive use, are considered highly detrimental to the environment. The dye Acid Red 114, is included in the class of azo dyes, and it is the chemical agent target of this study. This study is proposed to investigate the possibility of degradation by microorganisms isolated from the sludge of a textile industry and evaluate the toxicity of the Acid Red 114 dye and by-products generated in its biodegradation. To evaluate the toxicity of this dye parameters of genotoxicity and mutagenicity were considered. For the genotoxicity analysis, the comet assay in cultured human hepatoma (HepG2) was used. To evaluate the mutagenic potential, the micronucleus test (MN) in HepG2 cultured cells and *Salmonella*/microsome test were performed. Evidence of biodegradation was taken by physico-chemical method of spectrophotometry UV-Vis and FTIR. According to the results, the Acid Red 114 dye showed to be genotoxic and mutagenic to HepG2 cells but not mutagenic to *Salmonella typhimurium*. The biodegraded generated by the bacteria *Enterococcus faecalis* and *Alcaligenes faecalis* was genotoxic and mutagenic to HepG2 cells, but not mutagenic to *Salmonella*/microsome test. The biodegraded generated by the bacterium *Achromobacter nitridificans* showed in HepG2 cells, genotoxic potential, but was not mutagenic to HepG2 or *Salmonella*/microsome test. These toxicity results showed that the use of this dye requires great caution, as it can have adverse action in living beings, including humans, either by direct contact to the dye (e.g. occupational via or use of confectioned products) or by the inadequate treatment of textile effluents or water treatments that use water bodies that receive these wastewaters. It was also noted that the compounds generated by the degradation can still induce a high toxicity to living organisms.

Key words: Azo dyes. Genotoxicity. Mutagenicity. Comet assay. Micronucleus test. *Salmonella*/microsome test.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2AA – 2-aminoandraceno

4NQO – Óxido de 4-nitroquinolina

ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química

ABIT – Associação Brasileira da Indústria Têxtil e Confecção

AC – Aberrações Cromossômicas

AN – Anormalidades Nucleares

ANOVA – Análise de variância

B1 – Biodegradado 1

B2 – Biodegradado 2

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CBMN – Teste do MN com bloqueio da citocinese

CBPI – Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese

CCK-8 – *Cell Counting Kit 8*

CHL – Células de pulmão de Hamster chinês

CN – Controle Negativo

CO₂ – Dióxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COT – Carbono Orgânico Total

CP – Controle Positivo

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EC50 – Concentração Efetiva

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FTIR – Infravermelho com Transformada de Fourier

GC/MS – Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa

H4-IIIE – Células de hepatoma de rato

HaCaT – Queratinócitos humanos

HepG2 – Célula de carcinoma hepatocelular humano

his – Histidina

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a um detector de díodos

IC50 – Concentração Inibitória

kN – Quilonewton
LLC-MK₂ – Células epiteliais de rim de macaco *Rhesus*
MEM – Meio Essencial Mínimo
mL – Mililitro
MLA – Ensaio de Linfoma de Camundongos
MMS – Metilmetano Sulfonato
MN – Micronúcleo
MO – Microrganismos
MTT – Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm – Nanômetro
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PBTA – 2-fenilbenzotriazóis
PCA – *Plate Counter Agar*
pH – Potencial hidrogeniônico
RNA – Ácido Ribonucleico
S9 – Fração microsomal
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UV – Ultravioleta
UV-Vis – Ultravioleta Visível
V79-MZ – Fibroblastos de pulmão de Hamster chinês
µm – Micrômetro
µg – Micrograma
µL – Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	OBJETIVOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1	Corantes têxteis	17
3.2	Indústrias têxteis	18
3.3	Degradação de azocorantes.....	18
3.4	Genotoxicidade e Mutagenicidade	19
3.4.1	<i>Teste de Salmonella/microsoma</i>	20
3.4.2	<i>Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo (MN) em cultura celular de mamíferos.....</i>	21
3.4.3	<i>Utilização de cultura celular na avaliação de azocorantes têxteis</i>	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Material.....	24
4.1.1	<i>Substância química testada</i>	24
4.1.2	<i>Material biológico.....</i>	24
4.2	Métodos.....	25
4.2.1	<i>Preparo das concentrações.....</i>	25
4.2.2	<i>Isolamento dos microrganismos</i>	26
4.2.3	<i>Ensaio de Biodegradação</i>	30
4.2.4	<i>Espectrofotometria UV-Vis (ultravioleta/visível).....</i>	30
4.2.5	<i>Espectroscopia FTIR (infravermelho com transformada de Fourier).....</i>	31
4.2.6	<i>Teste do MTT</i>	31
4.2.7	<i>Teste de viabilidade com Azul de Tripán</i>	32
4.2.8	<i>Bioensaios com células HepG2.....</i>	32
4.2.9	<i>Teste de Salmonella/microsoma – Protocolo de Pré-incubação</i>	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	Artigo: Azocorantes têxteis e cultura celular: uma revisão	37

5.2	Teste do MTT	72
5.3	Teste de viabilidade com Azul de Tripán	73
5.4	Ensaio do cometa	75
5.5	Teste do Micronúcleo (MN)	77
5.6	Teste de <i>Salmonella</i> /microsoma – Protocolo de Pré-incubação	79
5.7	Isolamento e Identificação dos microrganismos	83
5.8	Ensaio de biodegradação	86
5.9	Espectrofotometria UV-Vis.....	87
5.9.1	<i>Espectro de absorção</i>	87
5.9.2	<i>Análise da biodegradação</i>	88
5.10	Espectrofotometria FTIR.....	90
6	Conclusões Gerais.....	94

1 INTRODUÇÃO GERAL

O aumento das atividades urbana e industrial elevou também as contaminações dos recursos hídricos e com isso, se tornou uma das principais preocupações da atualidade, visto que muitos resíduos são descartados diretamente nestes ambientes, ocasionando sérios problemas para os ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, à saúde humana.

Dentre as atividades antrópicas de maior impacto, estão a urbanização, as industriais e a agricultura. Neste cenário, as indústrias têxteis tem ganhado destaque, devido ao descarte de efluentes com grande potencial tóxico. Como os efluentes têxteis são lançados indiscriminadamente no ambiente, conferindo cor no meio ao qual são lançados, eles dificultam a penetração da luz neste local e interferem na fisiologia e, conseqüentemente, na vida das plantas e animais aquáticos. Além de promover acúmulo de corantes no meio e nos organismos, os efluentes das indústrias têxteis ainda podem ser transportados, por longas distâncias, e chegar em estações de tratamento de água, contaminando as água de abastecimento público (GUARATINI; ZANONI, 2000).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 define a classificação dos corpos de água superficiais, assim como as condições e padrões para lançamento de efluentes. As águas de Classe 1 são destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; proteção de comunidades aquáticas; recreação, como natação e mergulho; e irrigação de hortaliças e frutas que sejam consumidas cruas. As águas de Classe 2, ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; proteção de comunidades aquáticas; recreação, como natação e mergulho; irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, nos quais pode ocorrer contato direto do público; aquicultura e atividade de pesca. As águas de Classe 3, ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras e dessedentação animal. Para águas doces (águas com salinidade igual ou inferior a 0,5‰), os corantes provenientes de atividades antrópicas devem estar virtualmente ausentes em águas de Classe 1, enquanto que nas águas de Classe 2 e 3, eles são permitidos, desde que sejam removíveis por processos como coagulação, sedimentação e filtração convencionais. (BRASIL, 2005).

Ainda quanto à legislação pertinente à proteção de recursos hídricos, no que se refere exclusivamente aos lançamentos de corantes nos corpos d'água, foi aprovado o Projeto de lei nº 333/12, pela Assembléia Legislativa do estado de São Paulo, que proíbe o lançamento de

corantes em rios, lagos, represas e demais corpos de água doce do Estado de São Paulo, e também, determina a classificação dos corantes como contaminantes ambientais (SÃO PAULO, 2012).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), a indústria de corantes no Brasil têm seguido as tendências mundiais e tem realizado esforços para atender às regras de proteção ambiental, porém um grande número de indústrias que atuam no tingimento de tecidos são empresas de pequeno porte, o que dificulta a fiscalização.

Devido às legislações ambientais, novas tecnologias vem sendo desenvolvidas a fim de melhorar o tratamento desses efluentes contaminados, promovendo não só a remoção da cor, mas também os efeitos dos seus agentes tóxicos.

De acordo com Robinson et al. (2001), vários são os processos (químicos, físicos ou biológicos) desenvolvidos para remoção de corantes de efluentes industriais. Dentre eles, os processos biológicos de biodegradação e adsorção têm mostrado serem muito promissores. Estudos que envolvam a biodegradação e a descoberta de microrganismos eficazes na degradação de corantes auxiliam na redução dos danos que estes compostos químicos causam aos organismos expostos e ao meio ambiente (DE ANGELIS et al., 1982; KUNZ et al., 2002). Os efeitos tóxicos dessas substâncias podem ser avaliados em plantas, animais e microrganismos, sendo importante o desenvolvimento de estudos para avaliar o impacto e modo de ação destes agentes. Estudos de avaliação de impactos ambientais gerados por agentes tóxicos requerem atenção especial, pois estes estudos servem de alerta para perigos aos quais as populações possam estar expostas (RIBEIRO et al., 2003).

Diante deste cenário, o presente estudo foi realizado com a finalidade de avaliar a toxicidade do corante Acid Red 114, que pertence à classe dos azocorantes, em sua forma original e submetido a um processo de biodegradação por microrganismos isolados do lodo de uma lagoa de estabilização de uma indústria têxtil.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a toxicidade do azocorante têxtil Acid Red 114, em sua forma original e submetido a processos de biodegradação, por meio de ensaios de:

- Genotoxicidade: pela aplicação do teste do Cometa em cultura celular (HepG2);
- Mutagenicidade: por meio da aplicação do teste do MN em cultura celular (HepG2) e do teste de *Salmonella*/microssoma;

- Avaliar a possibilidade do uso de processo de biodegradação, para minimizar a toxicidade do azocorante têxtil Acid Red 114, por meio da utilização de consórcio de microrganismos, obtido junto à lagoa de estabilização de uma indústria de tingimento têxtil.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Corantes têxteis

A indústria de corantes têxteis teve origem na Europa, no século XVI, porém a descoberta do primeiro corante sintético ocorreu somente em 1856 (MOTSCHI, H., 1994; ESTLANDER, T., 1988). No Brasil, a produção industrial de corantes sintéticos teve início depois da Primeira Guerra Mundial, porém o país está relacionado aos corantes desde seu descobrimento, pois o próprio nome tem origem na madeira “Pau brasil”, que é a fonte de um corante natural avermelhado. A maioria das indústrias brasileiras estão localizadas, principalmente, no eixo Rio-São Paulo e, grande parte delas, possui dependência de alguns intermediários importados como derivados de benzeno, naftaleno, tolueno, etc. (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Corantes têxteis são compostos orgânicos cuja finalidade é conferir, sob condições de processo preestabelecidas, uma determinada cor às fibras têxteis (substrato). Estes corantes se impregnam nas fibras do substrato têxtil, reagindo ou não com o material, durante o processo de tingimento. Os componentes têxteis que controlam a fixação da molécula cromofórica ao substrato constituem a base para que ocorra a divisão de corantes têxteis em diferentes categorias químicas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA [ABIQUIM], 2011). Dentre essa gama de corantes utilizados no tingimento têxtil, destacam-se os azóicos ou azocorantes, que são compostos que possuem um ou mais grupamentos azo ($N=N$). Este tipo de corante é o mais produzido e também o mais consumido pelas indústrias têxteis. Segundo Guaratini e Zanoni (2000), estes azocorantes são largamente utilizados no tingimento de fibras naturais de algodão e sintéticas de poliéster. Dentro desta classe azóica está o Acid Red 114, alvo deste estudo.

A ampla utilização destes corantes acaba por lançar toneladas de resíduos destes compostos no meio ambiente, levando a sérios problemas ambientais, decorrentes da própria característica química dos mesmos. Estes compostos são fotoliticamente estáveis e, por isso, altamente persistentes no ambiente (TRINDADE et al., 1986; HOLME, 1984; HAO et al., 2000).

3.2 Indústrias têxteis

Na indústria têxtil, os azocorantes são utilizados no tingimento de algodão, lã, poliéster, dentre outros substratos (HUNGER, 1994). Além disso, os azocorantes também são muito utilizados em indústrias farmacêuticas, de alimentos, papel, couro e em impressão (CHUNG; CERNIGLIA, 1992).

Segundo dados da Texbrasil, que é um Programa de Internacionalização da Indústria da Moda Brasileira, criado pela ABIT (Associação Brasileira da Indústria Têxtil e Confecção), o Brasil é hoje o 5º maior produtor têxtil do mundo e o 4º maior produtor de confeccionados, com produção média de 9,8 bilhões de peças/ano. Estima-se que o número de empresas do setor no país seja de 33.114 empresas (TEXBRASIL, 2014).

De acordo com Giordano (2004), as indústrias têxteis abrangem desde a produção dos fios até os tecidos ou produtos finais. Todo esse processo envolve várias etapas, com tratamentos químicos variados, fazendo com que estes efluentes sejam ricos em produtos químicos, incluindo os próprios corantes utilizados. É estimado que no processo de tingimento pelo menos 20% dos corantes sejam descartados em efluentes, devido a perdas durante o processo de fixação da tintura às fibras (GONDIM et al., 2007).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), 75% das indústrias têxteis brasileiras estão localizadas nas regiões sul, sudeste e nordeste, principalmente nos estados de Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Bahia e Ceará.

3.3 Degradação de azocorantes

Devido à estabilidade ambiental dos azocorantes e aos problemas gerados pelos seus descartes no ambiente, têm sido testados e utilizados diversos métodos de tratamento desses corante, na tentativa de reduzir os possíveis impactos gerados pela sua contaminação (OLIVEIRA, 2005). Segundo Robinson et al. (2001), a remoção destes corantes pode ser feita por meio de processos: físicos, como floculação, adsorção, carvão ativado, cavacos de madeira, sílica gel, filtração por membranas, troca iônica, radiação UV, coagulação eletrocinética e filtração; ou química, por processos de oxidação, peroxidação de sais de ferro II (reação Fenton), ozonização, processos fotoquímicos de destruição eletroquímica, sistema UV-peróxido, cucurbituril (cadeia orgânica que promove o encapsulamento do corante) e por hipoclorito de sódio. Entretanto, ainda de acordo com Robinson et al. (2001), grande parte desses processos somente acumula ou concentra o corante, além de, segundo Jadhav et al.

(2007), também ter alto custo e gerar poluentes secundários, provenientes das substâncias químicas utilizadas nos processos de remoção. Desta forma, a degradação biológica desses compostos tem sido considerada um processo vantajoso de tratamento, pois não apresenta os problemas acima citados para as remoções física ou química.

Segundo Kunz et al. (2002), as indústrias têxteis geralmente utilizam em seus tratamentos os processos físico-químicos de precipitação-coagulação, acompanhados de tratamento biológico, por meio de lodos ativados, que são os sistemas biológicos mais utilizados nestas indústrias. Este sistema é relativamente eficiente, pois remove cerca de 80% dos corantes. Porém, como os corantes permanecem adsorvidos no lodo, que é gerado em grandes quantidades e disposto em aterros sanitários, pode acarretar em sérios problemas ambientais.

Devido à complexa estrutura química dos azocorantes e à sua persistência, após os processos de degradação biológica (HOLME, 1984; KIM; SHODA, 1999), deve-se levar em consideração a possibilidade de utilização de enzimas que possam auxiliar no processo de degradação, para garantir a eficiência do tratamento utilizado (BANAT et al., 1996; ÖZTÜRK; ABDULLAH, 2006; JADHAV et al., 2007). A eficácia dos microrganismos (MO) para descolorir e metabolizar corantes é conhecida há bastante tempo, o que tem gerado interesse na biodegradação para tratar os efluentes de indústrias têxteis (McMULLAN et al., 2001). Durante o processo de biodegradação, que acontece em condições anaeróbicas, começam a ocorrer clivagens nas ligações azo, o que leva à geração de aminas aromáticas, que, por sua vez, são recalcitrantes para as bactérias anaeróbicas (ZAOYAN et al., 1992; WEBER; ADAMS, 1995). Porém, estas aminas aromáticas poderão ser facilmente degradadas em processos subsequentes de biodegradação, agora por microrganismos aeróbicos (BROWN; LABOUREUR, 1983).

Segundo Oliveira (2005), diversos organismos podem atuar na biodegradação de corantes presentes em efluentes têxteis, porém alguns agem de forma mais eficaz do que outros (BANAT et al., 1996). É mais comum o uso de MO biodegradadores do grupo das bactérias e fungos, porém pode-se também utilizar nestes processos alguns tipos de algas (JINKI; HOUTIAN, 1992; ACUNER; DILEK, 2004) e plantas (AUBERT; SCHWITZGÜEBEL, 2004; MBULIGWE, 2005).

3.4 Genotoxicidade e Mutagenicidade

A molécula de DNA é alvo constante de danos causados por poluentes (KOVALCHUCK et al., 1998) e se esses danos não forem reparados ou forem reparados erroneamente pelos mecanismos celulares, podem resultar em mutações (CONNOR;

FERGUNSON, 1993; KIRSCH-VOLDERS, et al., 1998;). As mutações, quando ocorrem naturalmente, podem fazer parte do processo evolutivo de um organismo, mas também podem, como as induzidas por agentes químicos ou físicos, causar danos aos sistemas biológicos.

Os agentes mutagênicos são aqueles capazes de promover alteração na sequência das bases no DNA, acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações. Segundo Obe et al. (1982), a maior parte dos agentes mutagênicos altera o material genético, em qualquer fase do ciclo celular. Porém, para que as alterações se fixem, é necessário que haja um evento de replicação do DNA, logo após a ocorrência da alteração.

De acordo com Houk (1992), para uma eficiente investigação ambiental, é necessária uma escolha adequada do ensaio a ser utilizado. Essa escolha deve ser baseada não apenas nas características da amostra a ser avaliada, mas também em fatores como a adequabilidade do sistema-teste, o custo relativo do ensaio e a simplicidade do mesmo. Outro fator relevante é o uso de diferentes organismos-testes, o que pode oferecer informações mais diversificadas sobre o agente investigado.

Bioensaios realizados com procariotos tem a capacidade de detectar agentes que induzem mutações gênicas e danos primários no DNA. Enquanto que bioensaios com eucariotos são capazes de detectar uma amplitude maior de danos, que vão desde mutações gênicas até alterações cromossômicas estruturais e numéricas (HOUK, 1992).

3.4.1 Teste de *Salmonella/microsoma*

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, conhecido por Teste de *Salmonella/microsoma*, é uma ferramenta clássica de detecção da atividade mutagênica de diversos agentes químicos (FERRAZ et al., 2010). Este teste é a metodologia de triagem mais utilizada e aceita para detectar substâncias carcinogênicas e genotóxicas nos laboratórios de mutagênese ambiental (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). Este teste emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), que apresenta diferentes mutações no operon deste aminoácido, construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Em adição à essa mutação, estas linhagens ainda possuem três outros marcadores genéticos: a mutação *rfa*, que afeta a permeabilidade da parede celular e permite a passagem de moléculas de alto peso molecular; a deleção *uvrB*, que afeta a via de reparo por excisão do DNA e que torna as células dependentes de biotina; e a introdução do plasmídeo pKM101 (somente nas linhagens TA1535 e TA1538), para produção das linhagens isogênicas TA100, TA98, TA97, TA102 e TA104

(MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Tais linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura com ausência de histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Desta forma, o número de revertentes é facilmente mensurado pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população dessas bactérias à substância a ser testada (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Tem sido desenvolvidos e descritos na literatura, várias modificações no protocolo padrão de incorporação de placas. Dentre eles estão os protocolos de pré-incubação, que consiste em uma exposição de curta duração (20 a 30 minutos) em um pequeno volume de mistura (amostra, cultura bacteriana e tampão ou mistura S9), seguido de plaqueamento em ágar mínimo, e o de microsusensão ou teste de Kado, que é utilizado para pequenos volumes de amostra, com culturas concentradas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

3.4.2 Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo (MN) em cultura celular de mamíferos

A cultura de células de mamíferos tem sido utilizada, com sucesso, em diversos ensaios de monitoramento ambiental, principalmente em estudos de avaliação da mutagenicidade dos agentes tóxicos. Estes testes apresentam vantagens pela facilidade de padronização das condições do ensaio, pela possibilidade de realizar tratamentos das células em várias fases do ciclo celular e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991), além de serem reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (ROGERO et al., 2003). Outra vantagem é que pequenas amostras de células são suficientes para a realização das análises, não necessitam do sacrifício de vários animais (CARVALHO, 1996), o que, conseqüentemente, não esbarra nas questões de ética em pesquisa.

A linhagem celular HepG2 (*human-derived hepatoma cell line*) conserva muitas das características morfológicas do parênquima hepático (KNOWLES et al, 1980). Os ensaios realizados com esta linhagem celular demonstram, de forma eficaz, a metabolização de mutágenos, sem que seja necessária a adição de substâncias para desenvolvimento dessa função (UHL et al. 1999; VALENTIN-SEVERIN et al.,2003).

O ensaio do cometa é considerado um teste genotóxico rápido, simples e sensível, capaz de detectar danos no DNA de células individuais induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (PAVLICA et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006). Para Speit et al. (2009), o ensaio do cometa ganhou popularidade por ser um teste capaz de detectar baixos níveis de danos e reparos no DNA e por ser aplicável em diversos tecidos e/ou tipos celulares. Outras vantagens que o diferencia dos métodos citogenéticos

convencionais é que esta técnica requer um pequeno número de células e não necessita que estas estejam em divisão, podendo, então, ser aplicada em qualquer fase do ciclo celular (PAVLICA et al., 2001).

Os micronúcleos (MN) são massas de cromatina citoplasmática com aparência de pequenos núcleos, que surgem de fragmentos cromossômicos, de cromossomos inteiros atrasados durante a anáfase da divisão celular (FENECH, 2000) ou ainda de eventos de poliploidização (FERNANDES et al., 2007). Os MN são, portanto, porções cromossômicas não incorporadas (fragmentos ou cromossomos inteiros) ao núcleo principal da célula, após a divisão celular (SCHMIDT, 1976, AL-SABTI; METCALFE, 1995), devido à ausência de centrômero dos fragmentos acêntricos, danos no aparelho mitótico, defeitos na citocinese (BOLOGNESIM et al., 2006; ERGENE et al., 2007) ou ainda por expulsão do material genético excedente do núcleo, devido a poliploidização (FERNANDES et al., 2007). Para que uma estrutura seja considerada um MN clássico, ela tem que ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal, inclusive com a mesma refração, não estar ligada ao núcleo e ter um tamanho correspondente de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste do MN é largamente utilizado para avaliar danos genéticos causados por agentes químicos ou físicos (UDROIU, 2006), tendo grande sucesso para avaliar o potencial mutagênico de diversos poluentes (KLOBUCAR et al., 2003). Esta técnica é vantajosa pela sua simplicidade e aplicabilidade em diversas populações celulares em proliferação, sem necessitar de conhecimento prévio do cariótipo do organismo-teste (HAYASHI et al., 1998). Apesar de sua alta aplicabilidade, o teste do MN é dependente do ciclo celular, uma vez que, danos induzidos no primeiro ciclo serão visualizados como MN nos ciclos celulares posteriores (TATES et al., 1980). Por este motivo, no teste do MN *in vitro*, pode ser feito o uso de citocalasina B, que leva ao bloqueio da citocinese, mas não evita a divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas, formadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão durante a exposição aos tratamentos, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (FENECH, 1997; FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

3.4.3 Utilização de cultura celular na avaliação de azocorantes têxteis

A revisão de literatura pertinente à este tópico será apresentada a seguir no artigo de revisão “Azocorantes têxteis e cultura celular: uma revisão”. No artigo, foram reunidos e

discutidos as técnicas e resultados de vários trabalhos que avaliaram os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de azocorantes utilizados em indústrias têxteis, em diferentes culturas de células de mamíferos (vide página 38).

4 MATERIAL E MÉTODOS

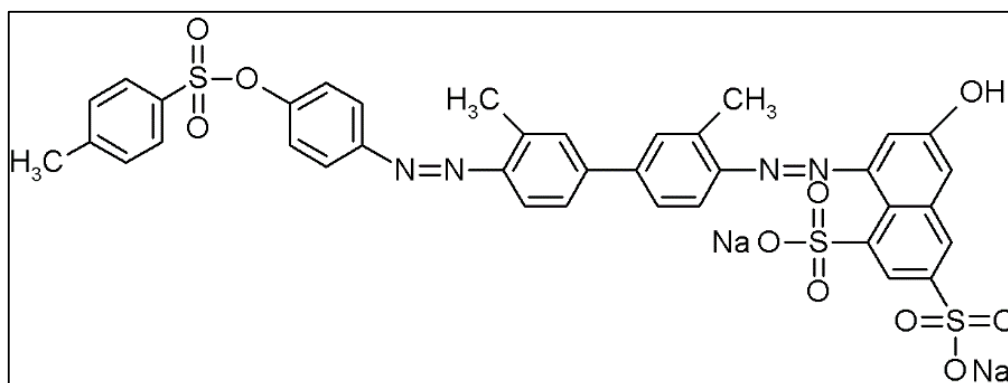
4.1 Material

4.1.1 Substância química testada

Foi analisado no presente trabalho o azocorante especificado a seguir, que é um composto químico utilizado em indústrias têxteis.

- Corante: Acid Red 114
- Produzido pela Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc.
- Código Sigma-Aldrich: 21.031-5
- Registro CAS (*Chemical Abstracts Service*): 6459-94-5
- Lote: BR 01406HN
- Massa Molecular: 830,81 g/mol
- Registro no Colour Index (C.I.): 23635
- Grau de Pureza: 45%
- Fórmula molecular: $C_{37}H_{28}N_4Na_2O_{10}S_3$
- Estrutura molecular:

Figura 1. Estrutura química do corante Acid Red 114



4.1.2 Material biológico

4.1.2.1 Cultura de células humanas

Foram utilizadas como organismo-teste, células de hepatoma humano (HepG2 - ATCC, HB8665), obtidas junto ao Laboratório de Toxicologia Ambiental, da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP/SP, que, por sua vez, obtiveram essa linhagem junto ao American Type Culture Collection (ATCC). As células foram mantidas no Laboratório de Mutagênese Ambiental do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro.

4.1.2.2 *Cultura bacteriana*

Foram utilizadas 2 linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*, a TA98, que apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese de histidina hisD3052, gene este que detecta mutação de deslocamento do quadro de leitura do DNA - Frameshift e a TA100, que apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese da histidina hisG46 e detecta mutação por substituição de pares de base. Estas linhagens são, comumente, utilizadas em estudos de avaliação da qualidade ambiental, por apresentarem uma grande eficiência em detectar a presença de um grande número de agentes mutagênicos (RIBEIRO et al., 2003).

4.1.2.3 *Microrganismos biodegradadores*

Foram utilizados, como agentes de biodegradação, os microrganismos (MO) presentes em um lodo derivado do tratamento de efluentes de uma indústria de tingimento de tecidos, lotada na cidade de Americana. Estes MO, por serem resistentes às condições adversas que os corantes proporcionam, têm potencialidade de utilizar, como fonte de energia para a sua sobrevivência, os compostos presentes nos corantes e, assim, promover uma degradação destes agentes.

4.2 Métodos

4.2.1 *Preparo das concentrações*

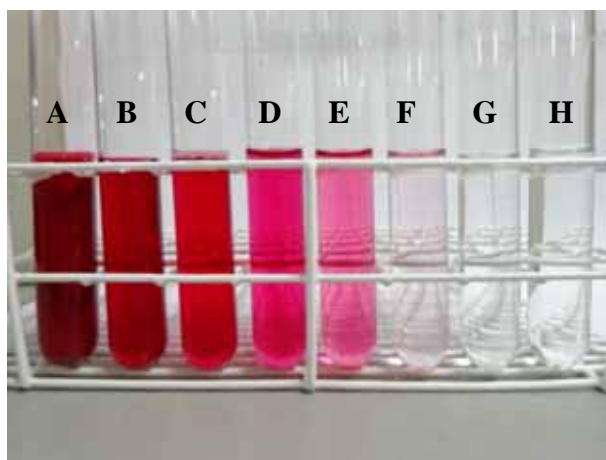
Foi preparada uma solução estoque de 5000 µg/mL, contendo 0,5 g do corante Acid Red 114 (45%) e 100 mL de água ultrapura. A partir desta solução estoque foram realizadas as devidas diluições para obtenção das demais concentrações: 500 µg/mL; 250 µg/mL; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 5 µg/mL; 0,5 µg/mL e 0,05 µg/mL. Todas as diluições foram preparadas em água ultrapura.

Após o preparo das soluções, cada concentração foi acondicionada em frascos individualizados e esterilizados, devidamente etiquetados e armazenados a 4°C, sob proteção da luz para evitar possíveis degradações.

Para que as soluções pudessem ser usadas em ensaios de cultura celular, as mesmas foram diluídas em meio de cultura específico, ou seja, o *Minimum Essential Medium* (MEM, Cultilab). Para obter a concentração final proposta, essas soluções foram misturadas em meio de cultura com soro na proporção 1:1, gerando as concentrações finais utilizadas para os testes: 2500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,025 µg/mL. Para o ensaio de *Salmonella*/microssoma, foram utilizadas as mesmas concentrações finais, porém diluídas com água ultrapura estéril, mantendo as mesmas proporções. A Figura 2 apresenta as soluções do corante em água ultra pura nas concentrações finais utilizadas nos ensaios.

O preparo das soluções foi realizado de maneira estéril, dentro do fluxo laminar, para se evitar possíveis contaminações.

Figura 2. Aspecto geral das soluções do corante Acid Red 114 dissolvido em água, nas diluições: A. 2500 µg/ml; B. 250 µg/ml; C. 125 µg/ml; D. 50 µg/ml; E. 25 µg/ml; F. 2,5 µg/ml; G. 0,25 µg/ml; H. 0,025 µg/ml.



4.2.2 Isolamento dos microrganismos

4.2.2.1 Preparo dos Meios de cultivo

- Meio Mineral

K ₂ HPO ₄	0,1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g
NaCl	0,01 g
CaCl ₂	0,01 g

FeCl ₂	0,002 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
Acid Red 114 (5000 µg/mL)	1 mL
H ₂ O	100 mL
pH = 7,2-7,5	

- Caldo Nutriente

Extrato de carne	0,6 g
Triptona de caseína	2 g
Cloreto de sódio	1 g
H ₂ O	200 mL

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave (20 minutos a 120 atm), assim como todos os materiais utilizados nos procedimentos.

4.2.2.2 Isolamento dos microrganismos

Etapa 1:

Foram preparados 4 frascos Erlenmeyer contendo 90 mL de meio mineral e 10 g do lodo industrial (derivado do tratamento de efluentes de uma indústria de tingimento de tecidos). Foi feita uma duplicata com meio mineral, contendo corante (LC), e a outra duplicata, com o meio sem corante (L). Os frascos foram colocados no shaker, em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) e sob agitação por 30 minutos. Decorrido este tempo, foi retirado 1 mL de cada uma das duplicatas e, em seguida, transferidos para um tubo com 9 mL de solução salina 0,85%. Dessa maneira, foram realizadas 5 diluições em série de cada amostra: 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴; 10⁻⁵ e 10⁻⁶. Destes tubos, foram feitos plaqueamentos *Pour Plate* (derramamento na placa), em duplicata, das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁶ em *Plate Counter Agar* (PCA). Para cada placa, foram adicionados 20 mL de PCA e 1 mL da respectiva diluição. As placas foram então suavemente submetidas a movimentos rotatórios, visando a homogeneização e espalhamento da cultura no ágar. Posteriormente, foram transferidas para estufa a 36°C e incubadas, invertidas, por 24 e 48 horas, períodos estes, em que foram contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

Etapa 2:

Os frascos LC foram colocados novamente em estufa, a 36°C e, nos tempos de 24; 48; 120; 144 e 168 horas, foram realizados os seguintes procedimentos: transferência de 1 mL de cada amostra para tubos com 9 mL de solução salina 0,85%, que foram, devidamente, armazenados em geladeira (4°C), seguido da adição de 2 mL do corante Acid Red 114 (5000 µg/mL) aos frascos. Após a manipulação, os frascos foram mantidos em estufa, nas mesmas condições anteriormente descritas, até o próximo tempo de coleta. Após a coleta do último tempo, os frascos foram armazenados em geladeira (4°C).

Foram feitos estriamentos das amostras nos tempos de 0; 24; 48; 120; 144 e 168 horas em placas com 20 mL de PCA. Os estriamentos foram realizados por meio da alça de platina, da seguinte forma: após flambar a alça de platina em chama, ela foi resfriada e mergulhada na amostra e, em seguida, passada repetidas vezes no ápice da placa, para esgotamento do material. Em continuidade, foram feitas as primeiras estrias, em movimento de zigue-zague, no 1º quadrante da placa. A alça de platina foi novamente flambada e a placa girada em 90°. Em seguida, a alça de platina foi passada pela ponta da estria anterior, para retirada de inóculo e confecção das estrias do 2º quadrante da placa. Da mesma forma, foram realizadas as estrias do 3º e 4º quadrante. Em seguida, as placas foram incubadas, invertidas, em estufa a 36°C por 24 horas.

Etapa 3:

Foram preparados 4 frascos Erlenmeyer com 75 mL de meio mineral sem corante, 25 mL do frasco LC (tempo de 168 horas) e 1 mL do corante Acid Red 114 (concentração final do frasco de 500 µg/mL). Dois frascos foram mantidos em condições aeróbias (LC1 e LC2) e colocados no shaker a 36°C, e os outros dois frascos (LC3 e LC4) foram mantidos em condições anaeróbias, em estufa a 36°C, não permitindo trocas gasosas. Os frascos LC2 e LC4 receberam também a suplementação de 0,25% de glicose; 0,25% de extrato de levedura e 0,25% de peptona. Os frascos permaneceram nessas condições por um período de 240 horas.

Após este tempo, foram confeccionados 4 novos frascos, para obtenção de um meio mais claro, com melhor visualização da biodegradação pelos microrganismos. Os frascos foram preparados com 90 mL do meio mineral sem corante, 10 mL dos frascos anteriores (LC1; LC2; LC3 e LC4) e 1 mL do corante Acid Red 114 (concentração final do frasco = 500 µg/mL). Os frascos foram colocados em estufa a 36°C por 24 horas.

Destes frascos, foram feitos estriamentos em placas de PCA + corante, na concentração de 50 µg/mL, para seleção das colônias formadoras de halo de degradação ou com capacidade de adsorção.

Etapa 4 - Purificação:

As colônias selecionadas foram estriadas em outras placas de PCA + corante, na concentração de 50 µg/mL e incubadas invertidas, em estufa a 36°C por 120 horas.

As colônias destas placas foram selecionadas novamente e em seguida, transferidas para frascos Erlenmeyer com 50 mL de caldo nutriente. Estes frascos foram colocados em estufa a 36°C por 48 horas e depois, armazenados em geladeira (4°C), para os procedimentos de identificação e para os ensaios de biodegradação.

Etapa 5 - Identificação:

Para o processamento inicial das amostras, foi pesado, com o auxílio de uma alça descartável estéril, 1,0 g da amostra em um tubo de vidro também esterilizado. Foi acrescentado 10 mL de solução salina a 0,85% e em seguida homogeneizado no Vórtex. Esta se caracterizou em uma diluição de 1/10, sendo também feitas as diluições de 1/100 e 1/1.000.

Para a diluição de 1/100, foi pipetado 1,0 mL do conteúdo do primeiro tubo em um segundo tubo contendo 9,0 mL de solução salina a 0,85%. Deste segundo tubo, após homogeneização, foi transferido 1,0 mL para o terceiro tubo que continha 9,0 mL de solução salina a 0,85%, assim sendo a diluição 1/1.000, homogeneizada no Vórtex. Foi realizada a diluição 1/1 em outro tubo, com 1,0 g do material e 1,0 mL de solução salina a 0,85%, em seguida homogeneizado no Vórtex.

Os materiais diluídos foram homogeneizados antes de cada semeadura. Foram semeados, com alças descartáveis estéreis, 10µL nos meios de cultura Ágar Sangue, Cromoágar, Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey, para avaliar, qualitativamente, as colônias.

As diluições finais das placas foram: 1/1.000 (diluição 1/10); 1/10.000 (diluição 1/100); 1/100.000 (diluição 1/1.000) e 1/100 (diluição 1/1).

Após 24 horas de incubação na estufa a 37°C, os diferentes MO encontrados foram identificados por meio de diversas provas bioquímicas manuais, conforme rotina do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas - UNICAMP e confirmados pelo sistema automatizado Vitek®2 Compact - BioMérieux®.

4.2.3 Ensaio de Biodegradação

Para o ensaio de biodegradação, foram utilizados os inóculos preparados anteriormente no processo de isolamento dos microrganismos do lodo industrial. Foram colocados 1 mL de cada inóculo (caldo nutriente) em 50 mL de meio mineral e deixado em estufa a 36°C por 24 horas, para estabilização.

Em seguida, foram preparados, em duplicata, 2 Erlenmeyers contendo meio mineral com 2% de inóculo (meio mineral) e o corante Acid Red 114, na concentração final de 100 µg/mL, com pH 6,5. Foram selecionados os 2 inóculos mais eficientes para o ensaio, totalizando 4 frascos. Também foram preparados frascos para controle, todos em duplicata, sem inoculação de bactérias, sendo uma duplicata somente com meio mineral e a outra em meio mineral mais o corante na concentração final de 100 µg/mL. Os frascos foram colocados em estufa, a 36°C.

Após homogeneização dos frascos, foram retiradas amostras, de maneira estéril, dentro do fluxo laminar, nos tempos inicial e final (0 e 144 horas), para os bioensaios com cultura celular, com *S. typhimurium* e para as leituras de espectrometria UV-Vis e FTIR. Todas as amostras foram filtradas em filtro de membrana 0,22 µm, identificadas e armazenadas, separadamente, em frascos estéreis, mantidos em geladeira (4°C), até o momento da sua utilização nos ensaios.

4.2.4 Espectrofotometria UV-Vis (ultravioleta/visível)

4.2.4.1 Espectro de absorção

Para obtenção do espectro de absorção, foi realizada varredura em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV-2401PC) do corante Acid Red 114. Para a leitura, foi preparada uma solução de corante em água ultra pura, na concentração de 100 µg/mL e pH 6,5. As varreduras ocorreram nos comprimentos de onda de 800 a 190 nm, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 5 mm.

4.2.4.2 Análise da biodegradação

As amostras coletadas no ensaio de biodegradação foram submetidas à leitura em espectrofotômetro UV-Vis, na região de 190 a 800 nm, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 5 mm. A partir destas análises espectrofotométricas, foi possível realizar os cálculos da absorbância relativa, para verificação da biodegradação.

4.2.5 Espectroscopia FTIR (infravermelho com transformada de Fourier)

Após o processo de biodegradação, as amostras foram analisadas por meio do espectrofotômetro FTIR (Shimadzu, IRPrestige-21). Um controle foi preparado com corante em meio mineral, na concentração de 100 µg/mL, sem inoculação de bactérias. As amostras foram colocadas em cadinhos previamente identificados, que foram mantidos em estufa para secagem, a 105°C por 24 horas. Posteriormente, os cadinhos foram transferidos para um dessecador à vácuo, por mais 12 horas, seguido da confecção das pastilhas.

As pastilhas foram preparadas com 1 mg da amostra (em peso seco) e 149 mg de KBr por meio da compressão a 40 kN por 5 minutos. As pastilhas confeccionadas foram devidamente colocadas no equipamento, que fez as leituras no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹, com 16 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹. As bandas referentes ao corante foram identificadas com auxílio da literatura.

4.2.6 Teste do MTT

O teste do MTT é um ensaio colorimétrico, desenvolvido inicialmente por Mosmann (1983), para medir a viabilidade celular, de acordo com a atividade metabólica das células. O sal MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma, CAS 298-93-1) é de coloração amarela, solúvel em água, que pode ser metabolicamente reduzido por células viáveis em um sal insolúvel (formazano) de coloração roxa (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O teste do MTT foi realizado em placas de ELISA de 96 poços. Foram semeadas, aproximadamente, $2,34 \times 10^4$ células por poço, em um volume total de 100 µL de meio com soro, exceto nos poços referentes ao branco, onde foi adicionado apenas o meio de cultura. A placa foi incubada por 24 horas para estabilização das células. Decorrido as 24 horas, o meio foi retirado e um novo meio de cultura (sem soro) foi adicionado juntamente com os tratamentos (2500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,025 µg/mL), totalizando um volume final de 200 µL. Para validação do experimento, foram realizados testes de controle positivo (CP – com Triton X-100, Merck, diluído em meio de cultura sem soro – solução a 1%) e controle negativo (CN – apenas em meio de cultura sem soro), em poços específicos. Os tratamentos e os controles permaneceram nos poços por um período de 24 horas sendo, posteriormente, retirados dos poços. Foram realizadas lavagens com PBS para retirada do corante e em seguida, foram colocados 150 µL de MTT e substituídos por 150 µL de MTT, diluído em PBS, na concentração de 1×10^{-6} mg/mL. Após a adição do MTT,

a placa foi incubada por 4 horas, em estufa a 37° C. Depois deste tempo, a solução de MTT foi descartada, sendo adicionados, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca, filtro de 540 nm (Aparelho Multiskan FC – ThermoScientific) e os valores de leitura foram transformados em porcentagem de viabilidade.

4.2.7 Teste de viabilidade com Azul de Tripán

O teste de viabilidade com o corante Azul de Tripán (0,4%, GIBCO, Cat. Nº 15250-061) foi realizado em placas de ELISA de 6 poços. Foram semeadas, aproximadamente, 5×10^5 células por poço, em um volume total de 2 mL de meio com soro. As placas foram incubadas por um período de 24 horas, para estabilização. Decorrido essas 24 horas, o meio foi retirado e um novo meio de cultura (sem soro) foi adicionado, juntamente com os tratamentos. Este ensaio foi realizado em duplicata. Para validação do experimento, foram realizados testes de controle positivo (CP – com Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro – solução a 1%) e controle negativo (CN – apenas em meio de cultura sem soro). Nos demais poços, foram adicionadas as diferentes concentrações do corante Acid Red 114 (2500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,025 µg/mL). Os tratamentos permaneceram nos poços por dois tempos diferentes (3 horas e 24 horas). Decorridos estes tempos, os poços foram lavados duas vezes com 2 mL de PBS, para retirada do excesso de corante e, posteriormente, as células foram removidas da parede dos poços pela incubação de 200 µL de tripsina 0,5%, por 5 minutos, a 37°C (em estufa de CO₂). Em seguida, a reação foi inativada com 600 µL de meio com soro. As suspensões com células foram transferidas para eppendorfs devidamente identificados. Em outro eppendorf, foram misturados 20 µL de azul de tripan com 20 µL da solução celular homogeneizada, que foram transferidos para a Câmara de Neubauer, para contagem em microscopia de luz (aumento de 400x). Os dados obtidos foram posteriormente transformados em porcentagem, para avaliação da viabilidade das concentrações testadas, considerando as concentrações com viabilidade maior ou igual a 80%.

4.2.8 Bioensaios com células HepG2

Para a realização dos experimentos, as células HepG2, que estavam mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em meio MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab) e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL, Sigma-Aldrich).

Os frascos contendo as células foram mantidos em estufa de CO₂, a 37°C, por um tempo suficiente para a obtenção de, pelo menos, 2 repiques celulares, para que as células se estabilizassem. Os repiques para confecção dos frascos foram realizados lavando-se os frascos duas vezes com PBS, tripsinizados com Tripsina-EDTA 0,5% por 5 minutos a 37°C e posterior inativação com 1,5 mL de meio MEM suplementado. Em seguida, as células foram passadas em seringa estéril de 1 mL para dissociação das células. Após a confluência dos frascos repicados, foram realizados novos repiques que deram origem a 21 novos frascos, com aproximadamente, 5×10^5 células, para serem usadas no ensaio do cometa e 1×10^6 células, para o teste do MN, quantidades estas, necessárias para a realização dos experimentos. Estas células foram mantidas nas condições ideais para o cultivo (37°C em estufa de CO₂), por 24 horas, para estabilização das condições. Esse período corresponde a 1 ciclo de divisão celular e o tempo necessário para a aderência das células no frasco. O CP foi preparado com MMS na concentração 4×10^{-4} M, para o ensaio do cometa, e de 4×10^{-2} M, para o teste do MN. Após as 24 horas, as células foram expostas aos tratamentos, antes e após o processo de biodegradação. Antes da biodegradação, os ensaios se constituíram dos seguintes tratamentos: CN (meio de cultura – MEM e PBS), CP (meio de cultura – MEM e MMS) e às concentrações do corante: 50 µg/mL; 25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,025 µg/mL. Após a biodegradação, o ensaio foi constituído dos tratamentos: CN (meio de cultura – MEM e PBS), Cmeio (meio de cultura – MEM e meio mineral), CP (meio de cultura – MEM e MMS), biodegradado 1 (B1) e biodegradado 2 (B2). Os ensaios foram realizados em triplicata e, após o período de exposição (3 horas), foram submetidos ao teste do cometa e do MN.

4.2.8.1 Ensaio do Cometa

Para o teste do cometa, foi realizada uma coleta da suspensão celular, depois de 3 horas de exposição aos tratamentos. O meio de cultura foi descartado e os frascos foram lavados com 5 mL de PBS, por duas vezes. As células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,5%) por 5 minutos a 37°C e inativadas com 5 mL de meio MEM suplementado. Este material foi transferido para tubos Falcon® e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a suspensão celular homogeneizada. Posteriormente, a suspensão foi passada por seringa de insulina de 1 mL, afim de se obter células isoladas. Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foram transferidos para um eppendorf 20 µL da suspensão celular e 20 µL do corante Azul de Tripán. Para a continuidade do ensaio do cometa, o valor de viabilidade

celular deve ser superior a 80%. A quantificação das células viáveis (brancas) e mortas (azuis) foi realizada em câmara de Neubauer.

Para o ensaio do cometa, lâminas previamente cobertas com agarose comum (1,5%) foram montadas com 20 μ L da suspensão celular + 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5% a 37°C). As lâminas, preparadas em duplicata, foram então cobertas por lamínulas e levadas à geladeira (4°C) por 15 minutos. Após este tempo, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas foram banhadas em solução de lise gelada (1% de Triton X-100, 10% de DMSO e 89% de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, e mantidas no escuro, em geladeira a 4°C, por 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese, contendo uma solução tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), por 20 minutos, para a desnaturação do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 40 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas, em 3 séries de 5 minutos cada, em tampão de neutralização (pH 7,2). Após a neutralização, as lâminas foram fixadas, por 10 minutos, em etanol absoluto e coradas com 50 μ L de solução de GelRed® (15 μ L de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada), sendo imediatamente analisadas em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 34 (excitação: λ =420 n - 490nM, barreira: λ =520 nM), objetiva de 40x.

Foram analisados 100 nucleóides por lâmina, totalizando 300 nucleóides por tratamento. Os nucleóides foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos em classe 0, nenhum ou pouco dano; classe 1, pequeno dano; classe 2, médio dano; classe 3, grande dano (KOBAYASHI et al., 1995). Os escores de cada tratamento foram submetidos ao teste estatístico ANOVA: um critério/Dunnett ($p < 0,05$), para comparação dos resultados entre os tratamentos e o CN.

4.2.8.2 *Teste do Micronúcleo (MN)*

Após a exposição de 3 horas aos tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS, o meio de cultura de cada frasco foi trocado e foram adicionados 3 μ g/mL de citocalasina B (Sigma-Aldrich), onde permaneceram, por mais 28 horas, para obtenção de células binucleadas. Após esse período, foi realizada a coleta das células.

O meio de cultura de cada frasco foi reservado. Foram realizadas 2 lavagens das células com PBS, para posterior tripsinização (Tripsina-EDTA 0,5%) de 5 minutos a 37°C. Em seguida, o meio de cultura reservado foi utilizado para inativação da tripsina. As células desprendidas

do fundo dos frascos, foram transferidas, junto com o meio de cultura, para tubos Falcon[®], por meio de seringas de insulina, para obtenção de células isoladas. Os tubos foram então centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, deixando apenas 0,5 mL, sendo então adicionado 5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio 0,01%, para posterior homogeneização. Após 5 minutos em contato com esta solução, foram adicionadas 2 gotas de formol 40%, seguido de suave homogeneização. Os tubos foram mais uma vez centrifugados (1500 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante, descartado, mantendo-se 0,5 mL. O material foi ressuscitado em 5 ml de fixador *Carnoy* (3 etanol: 1 ácido acético, v:v) e armazenado em freezer (-20°C), até a confecção das lâminas.

Para confecção das lâminas, estas foram previamente lavadas e mantidas em água ultrapura a 4°C. O material fixado foi centrifugado (1500 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado para adição de 1 mL de novo fixador. Após homogeneização da suspensão celular, esta foi gotejada sobre lâminas contendo um filme de água e, após serem secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa 5% em tampão Sorensen, por cerca de 6 minutos.

Para cada frasco, foram analisadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, totalizando 3.000 células por tratamento.

A análise de significância dos resultados foi realizada pelo teste estatístico ANOVA: um critério/Dunnett ($p < 0,05$).

4.2.9 Teste de *Salmonella/microsoma* – Protocolo de Pré-incubação

As linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* foram inoculadas em caldo nutriente contendo ampicilina e depois incubadas em shaker, a uma temperatura de 37°C, overnight. Para cada linhagem, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 650 nm (Thermo Scientific, BioMate 3), até se obter leitura na faixa de 0,40 de absorbância, valor esse, referente à $1-2 \times 10^9$ UFC/mL. Em seguida, para cada tubo de cultura (3 tubos por tratamento, 2 tubos para CP e 5 tubos para CN), foram adicionados 100 µL de cada linhagem, 500 µL de tampão fosfato e 100 µL dos tratamentos avaliados ou 10 µL da substância utilizada nos controles positivos - CP. Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9, o tampão fosfato 0,2 M foi substituído por 500 µL de mistura S9 (água destilada esterilizada, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais, KCl 1,65 M e MgCl₂ 0,4M, e fração S9). Para o CN, foram adicionados 100 µL de cada linhagem de bactéria aos tubos de cultura contendo 500 µL de tampão fosfato ou de mistura S9 e 100 µL do solvente utilizado para diluir a amostra (para o ensaio antes da biodegradação foi utilizado água esterilizada como solvente e para o ensaio

após a biodegradação, foi utilizado o próprio meio de cultura para a biodegradação). Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri esterilizadas contendo 20 mL de ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas, invertidas, em estufa bacteriológica a 37°C por 66 horas.

Os testes com os tratamentos foram realizados em triplicata, o CP em duplicata e o CN, em quintuplicata. Como CPs, foram utilizados o óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS 56-57-5), na concentração de 0,05 µg/µL, para os testes realizados na ausência de ativação metabólica e o 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25 µg/µL, para os testes realizados na presença de ativação metabólica. Como controle negativo (CN), foi utilizada água ultra pura.

Para o desenvolvimento dos testes com ativação metabólica, foi utilizado um sistema de metabolização exógeno (sistema microssomal S9, Moltox), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com a mistura bifenil policlorinada (Araclor 1254) a 4% (v/v), segundo Maron e Ames (1983).

Para a análise da mutagenicidade, foram contadas, manualmente, as colônias de bactérias revertentes. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA e considerados positivos, quando os resultados do teste estatístico e de dose resposta foram significativos, segundo o modelo de Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982), que utiliza regressão linear e ANOVA. Os resultados foram expressos pelo número de revertentes por miligrama da amostra testada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico serão apresentados todos os resultados obtidos durante a realização deste trabalho, com a adição de um artigo de revisão dentro do enfoque deste estudo, que será submetido a algum periódico da área de pesquisa.

5.1 Artigo: Azocorantes têxteis e cultura celular: uma revisão

AZOCORANTES TÊXTEIS E CULTURA CELULAR: UMA REVISÃO

Nádia Aline Corroqué, Márcia Miyuki Hoshina, Bruna de Campos Ventura Camargo, Maria Aparecida Marin-Morales.

Departamento de Biologia, Instituto de Bioeciências, UNESP, Avenida 24 A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

Artigo a ser submetido

RESUMO

As atividades industriais são importantes fontes poluidoras dos recursos hídricos e, dentre as indústrias mais impactantes para o meio ambiente, destacam-se as indústrias têxteis, que, durante seus processos de tingimento, geram uma grande quantidade de efluentes, que são descartados no meio ambiente. Essas indústrias utilizam diversos tipos de corantes, dentre eles, os azocorantes, que são extensamente produzidos e utilizados para o tingimento têxtil. Essa classe de corantes também é importante por sua estabilidade, característica esta que confere uma alta persistência aos azocorantes, principalmente para o ambiente aquático, tornando-os um dos grupos mais deletérios entre os corantes sintéticos. Além disso, os tratamentos convencionais não são totalmente eficientes para a total remoção destes corantes do meio. Diversos sistemas teste são utilizados para se avaliar os efeitos deletérios de uma determinada substância, dentre estes, podemos destacar os ensaios desenvolvidos com cultura de células de mamífero. Esta revisão tem como objetivo reunir e discutir os trabalhos que avaliaram os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de azocorantes utilizados em indústrias têxteis, sob diversas culturas de células de mamíferos.

Palavras-chave: Corantes sintéticos. Ensaio *in vitro*. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Mutagenicidade.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação dos recursos hídricos é uma das principais preocupações da atualidade, pois ela pode interferir na qualidade da água, causando distúrbios no ecossistema como um todo e também na saúde humana. As principais fontes poluidoras dos sistemas hídricos são os efluentes domésticos, agrícolas e industriais. Dentre as atividades industriais que mais causam impactos nos recursos hídricos, destacam-se as das indústrias têxteis.

Alguns dados indicam que a produção de corantes está estimada, em mais de 800.000 toneladas por ano e os corantes azoicos representam 60 a 70% deste montante, com aproximadamente 3000 corantes em uso (CARLIELL et al., 1995; VAN DER ZEE, et al., 2001; HUNGER, 1994). Estes corantes são os maiores constituintes dos efluentes das indústrias têxteis e, por isso, mais amplamente estudados (HUNGER, 2003; VAN DER ZEE, 2002).

Os corantes são constituídos de grupos cromóforos (nitro, nitroso, azo, carbonila e dos anéis de quinona) e de grupos auxocromos (etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metóxi, etóxi, cloro e bromo). Os azocorantes são caracterizados pela presença de, pelo menos, um grupo azo ($-N=N-$), como pode ser visto na Figura 1, mas também podem conter dois (diazó), três (triazó), quatro (tetrazó) ou mais (poliazó) grupos azo em sua molécula (HUNGER, 2003). De acordo com Ventura-Camargo e Marin-Morales (2013), devido à característica química dos azocorantes, este corante constitui o grupo mais detrimental dentre os corantes sintéticos, uma vez que são altamente persistentes no ambiente aquático.

Na indústria têxtil, os azocorantes são utilizados no tingimento de algodão, lã, poliéster, dentre outros substratos (HUNGER, 1994). Além disso, os azocorantes também são muito utilizados em indústrias farmacêuticas, de alimentos, papel, couro e em impressão (CHUNG; CERNIGLIA, 1992).

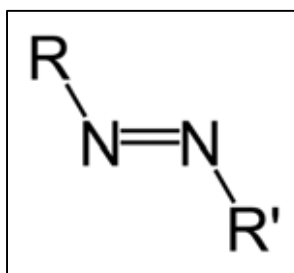
A ampla utilização destes corantes acaba por lançar toneladas de resíduos destes compostos no meio ambiente, que leva a sérios problemas ambientais, tanto pela possibilidade de se converter em produtos aromáticos mutagênicos e carcinogênicos como pela sua dificuldade de removê-los dos efluentes, durante os tratamentos convencionais das indústrias têxteis (CLARKE; ANKILER, 1980; ZBAIDA, 1995).

A avaliação dos efeitos deletérios dos azocorantes pode ser realizada por diversos sistemas-teste, como, por exemplo, pela cultura de células de mamíferos. Este sistema-teste tem sido utilizado, com sucesso, em diversos ensaios de monitoramento ambiental, principalmente em estudos de avaliação da mutagenicidade dos agentes tóxicos. A cultura de células apresenta vantagens como sistema-teste pela facilidade de padronização das condições do ensaio, pela possibilidade de realizar tratamentos das células em várias fases do ciclo celular e pela

organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991). Além disso, esses ensaios também possibilitam a limitação das variáveis experimentais; a realização dos testes, na maioria das vezes em períodos mais curtos que os ensaios *in vivo*; e são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (ROGERO et al., 2003). São testes cujos resultados apresentam grande correspondência com ensaios realizados com o sistema humano, o que possibilita a avaliação de indução de mutações importantes na etiologia de doenças degenerativas, como câncer e outras doenças genéticas (RIBEIRO et al., 2003). Outra vantagem ainda é que pequenas amostras de células são suficientes para as análises, não necessitando o sacrifício de vários animais (CARVALHO, 1996), e, conseqüentemente, não esbarrando nas questões de ética em pesquisa.

Os ensaios com cultura celular permitem avaliar os parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Os agentes citotóxicos podem induzir nos organismos e em linhagens celulares mantidas em cultura a redução da atividade celular ou alterações celulares (ROGERO et al., 2003). O agente genotóxico é aquele capaz de causar danos ao material genético do organismo/célula, porém com a possibilidade de correção do erro pelo sistema de reparo, enquanto que agentes mutagênicos causam danos que não são reparados pelo sistema celular e são transmitidos às gerações seguintes.

Figura 1. Fórmula estrutural do grupo azo.



Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Azo-group.png>

Pelo amplo uso de azocorantes na indústria têxtil e pelos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos comprovados para diferentes organismos, esta revisão traz importantes informações sobre os efeitos desta família de corantes têxteis, para diferentes culturas de células de mamíferos.

2 CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade são realizados expondo-se as células a um dado agente, para posterior avaliação da sua possível potencialidade de redução de alterações celulares, e para

relacionar os efeitos observados com o mecanismo de ação do xenobionte (ROGERO et al., 2003). Compostos com alta citotoxicidade apresentam, por exemplo, a capacidade de inibir totalmente o processo de divisão celular.

Nos ensaios com cultura celular, a citotoxicidade pode ser avaliada pela dinâmica do crescimento celular do próprio frasco de cultura, como pela contagem das células do meio (RIBEIRO et al., 2003). A avaliação deste parâmetro ainda pode ser realizada de modo qualitativo ou quantitativo. A análise qualitativa é feita por observação microscópica, onde são observadas a presença de possíveis alterações na morfologia celular, vacuolizações, lise celular ou de membrana. Pela análise qualitativa, a citotoxicidade pode ser classificada como atóxica, levemente citotóxica, moderadamente citotóxica ou severamente citotóxica, ou ainda seguindo uma classificação numérica (0, 1, 2 e 3), que varia de acordo com a intensidade das alterações. Já a análise quantitativa é realizada por meio de quantificações (contagens) de células em processo de morte celular, pelo índice de proliferação celular ou ainda pelo número de colônias celulares formadas. Essa análise também pode ser feita por meio da quantificação de produção proteica, liberação de enzimas específicas, liberação ou redução de corante vital, dentre outros parâmetros (ROGERO et al, 2003).

2.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

2.1.1 Exclusão do corante Azul de Tripán

O teste de exclusão do corante azul de tripan é utilizado para avaliar a viabilidade celular (MISHELL; SHIIGI, 1980), usando como parâmetro de avaliação a integridade da membrana celular. Quando as membranas celulares estão íntegras, não há interação entre a célula e o azul de tripan, pois o corante só atravessa a membrana se esta estiver danificada. Assim, células viáveis são impermeáveis ao corante, enquanto que células mortas (inviáveis) se tornam permeáveis a ele, passando a apresentar a coloração azulada do corante (FRESHNEY, 2005).

Hahon (1985) avaliou, por meio do ensaio de azul de tripan, o efeito de 3 diferentes corantes têxteis (Benzopurpurina 4B, Direct Blue 15 e Congo Red) e dos seus respectivos compostos derivados (*o*-Tolidina, *o*-Dianisidina e Benzidina) em células LLC-MK₂ (derivadas de rim de macaco *Rhesus*), para estimar qual a concentração máxima do corante tolerável por estas células, considerando neste teste, uma viabilidade maior que 95%. Foi verificado que a tolerância das células foi de 3 a 50 vezes maior para os corantes do que para seus compostos derivados e que os corantes que apresentaram maior concentração tolerável pelas células (Direct

Blue 15, Congo Red e Benzopurpurina 4B, respectivamente) foram os que obtiveram os menores índices de tolerância para os seus derivados.

O teste de viabilidade com azul de tripan também foi utilizado por Chequer et al. (2009), para avaliar a viabilidade celular de células de hepatoma humano (HepG2), para as concentrações 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 1 µg/mL; 2 µg/mL e 4 µg/mL dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1. Após exposição às concentrações testadas dos azocorantes, os autores observaram uma taxa de sobrevivência maior ou igual a 80% para todos os tratamentos, concluindo que este corante não foi potencialmente citotóxico nas condições avaliadas.

2.1.2 Iodeto de propídio/Anexina V

Nos processos de morte celular por apoptose, o fosfolípido fosfatidilserina, constituinte da lâmina interna da bicamada lipídica da membrana plasmática, é mobilizado para a lâmina externa da membrana (mecanismo flip-flop), ficando exposto à ligação da anexina V, que é uma substância que possui uma alta afinidade por este fosfolípido. A morte celular por apoptose ou necrose são diferenciadas pela característica estrutural da membrana, que se mantém íntegra na apoptose, mas não na necrose. A entrada do corante iodeto de propídio é dependente da permeabilidade da membrana celular. Como esse corante é excluído em células que apresentam suas membranas íntegras, as células em processos iniciais de apoptose não retém o corante no seu interior célula, mas este permanece em células necróticas e em células apoptóticas tardias, se incorporando ao DNA das mesmas (VERMES et al., 1995). Assim, a anexina V atua como um marcador para elementos iniciais da apoptose, enquanto que o iodeto de propídio identifica células em processos necróticos e apoptose tardia (membrana fragmentada).

Ferraz et al. (2011b) analisaram, em células HepG2, a diferença do potencial citotóxico entre os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13, por meio do teste de viabilidade celular com iodeto de propídio/anexina V. Após avaliação em citometria de fluxo, não houve resultados significativos entre os corantes, nem dos mesmos com relação ao controle, sugerindo que estes corantes não são potencialmente citotóxicos para as células testadas.

Ferraz et al. (2011a) avaliaram os efeitos citotóxicos do corante Disperse Orange 1, nas concentrações de 2,5 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL, por meio do teste de viabilidade celular com iodeto de propídio/anexina V em células HepG2, pelo período de exposição de 24 a 72 horas e posterior a 72 horas. Por meio da citometria de fluxo, foi possível verificar que não houve resultado significativo para indução de necrose, mas ocorreu indução de apoptose, após 72 horas de exposição, em todas as concentrações testadas, comprovando assim o potencial citotóxico para este corante. Ferraz et al. (2013) também realizaram um estudo comparativo

com este corante, antes e após processo de fotoeletrolise com nanotubos de Ti/TiO₂. Os autores demonstraram, pelo mesmo teste de viabilidade celular citado acima (células HepG2) que, após a fotoeletrolise, houve um decréscimo do potencial citotóxico do corante, observado pela redução dos índices de morte celular por apoptose, pós fotoeletrolise. Com isso, pode-se sugerir que este tratamento reduz, de forma eficaz, o potencial citotóxico deste corante.

2.1.3 Laranja de acridina/ Brometo de etídio

O corante laranja de acridina penetra em células vivas e em células em processo inicial de morte, por ainda apresentar membrana intacta, emitindo uma fluorescência de cor verde, quando intercalado ao DNA, e de cor laranja, quando intercalado ao RNA. O brometo de etídio somente penetra em células com membranas danificadas (em necrose ou apoptose tardia), emitindo fluorescência de cor laranja, quando intercalado ao DNA. Assim, as células são classificadas de acordo com os critérios abaixo (TAKAHASHI et al., 2004):

- 1) Células viáveis - com membrana intacta: núcleo uniformemente verde
- 2) Células em apoptose inicial - ainda apresentam membrana intacta: núcleo verde, mas não uniformemente corado
- 3) Células em fase tardia de apoptose: presença de áreas alaranjadas no núcleo
- 4) Células necróticas: núcleo uniformemente laranja

Tsuboy et al. (2007) analisaram, em células HepG2, a citotoxicidade do corante comercial Disperse Blue 291, nas concentrações de 200 µg/mL a 1000 µg/mL, para um tempo de exposição de 24 horas, por meio do teste de viabilidade celular com os corantes laranja de acridina e brometo de etídio. De acordo com os resultados obtidos, o corante promoveu um aumento dose-dependente nos índices de apoptose e necrose, reduzindo, consecutivamente, a viabilidade celular.

2.1.4 Vermelho Neutro

O corante vermelho neutro é um corante vital, solúvel em água. Como a membrana celular é permeável a este corante, ele atravessa a membrana e se liga a sítios aniônicos da matriz lisossomal, conferindo a coloração avermelhada para a célula. Substâncias que causam danos às membranas levam a uma redução da captura e ligação deste corante, fazendo com que o corante não entre na célula e, conseqüentemente, esta não apresente a coloração característica. Assim, a intensidade da coloração caracteriza um parâmetro de avaliação de viabilidade celular (CIAPETTI et al., 1996).

Wang et al. (2003) analisou, pelo ensaio do vermelho neutro, os efeitos citotóxicos do corante Remazol Black 5 em células de hepatoma de rato (H4-IIIE), após o processo de degradação por ozonização. Soluções com o corante, antes da realização do tratamento, mostraram citotoxicidade relativa de cerca de 45%, enquanto que as soluções tratadas por 30 minutos sob ozonização apresentaram um aumento da citotoxicidade para 75%. Os resultados obtidos no trabalho mostram um aumento da citotoxicidade nos primeiros 120 minutos de ozonização, onde os autores inferem que ocorre a formação de intermediários que são tóxicos para as células. De acordo com o estudo, é necessário um tempo maior de ozonização, não só para retirada da cor, mas também para eliminação dos primeiros subprodutos tóxicos produzidos.

2.1.5 Teste do MTT/ Kit de contagem de células 8 (CCK-8 – Cell Counting Kit 8)

O teste do MTT é um ensaio colorimétrico, desenvolvido inicialmente por Mosmann (1983), para medir a viabilidade celular, de acordo com a atividade metabólica das células. O sal MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), que tem coloração amarela e é solúvel em água, pode ser metabolicamente reduzido na mitocôndria de células viáveis, em um sal insolúvel (formazano) de coloração roxa (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Segundo Mosmann (1983), quanto maior a quantidade de formazano gerada, maior é a quantidade de células viáveis. Sendo assim, a viabilidade celular pode ser quantificada pela redução do MTT a formazano, por meio de avaliações colorimétricas, testes estes que inferem a atividade metabólica da célula testada.

O CCK-8 (*Cell Counting Kit 8*) consiste em um ensaio de citotoxicidade colorimétrico que utiliza um sal de tetrazólio, o WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazólio, sal monossódico], para determinar a viabilidade de células em proliferação. As enzimas desidrogenases da mitocôndria reduzem o WST-8, gerando um produto de cor alaranjada (formazano), que, por ser solúvel em água, é solúvel no meio de cultura celular. A quantidade de formazano gerada pela atividade das enzimas desidrogenases nas células é diretamente proporcional ao número de células viáveis (DOJINDO, 2012)

Ferraz et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13, por meio dos ensaios do MTT e CCK-8, em cultura de células da linhagem HepG2, tanto em monocamada como tridimensional, após exposição a 24, 48 e 72 horas em diferentes concentrações desses corantes. Neste estudo, todos os corantes mostraram indução de citotoxicidade, porém o corante Disperse Orange 1 apresentou redução da atividade mitocondrial, apenas na cultura celular em monocamada. Como a cultura celular tridimensional

simula a arquitetura e bioquímica do tecido *in vivo*, esta resposta pode indicar a ausência de ação do corante em tecidos biológicos, mas, por outro lado, indica atividade em células isoladas. Os resultados para o corante Disperse Red 13 mostraram-se mais preocupantes, pois foram observados os maiores índices de redução da atividade mitocondrial e da enzima desidrogenase em ambos os ensaios realizados.

2.1.6 Índice Mitótico (IM)

O IM é dado pela capacidade das células se dividirem e, assim, se multiplicarem. A indução de redução ou aumento do IM possibilita a determinação dos níveis de citotoxicidade de um dado agente (FERNANDES et al., 2007). A redução no IM por ação de xenobiontes pode levar a alterações tanto no crescimento como no desenvolvimento do organismo, enquanto que o aumento no IM, que é dado pelo aumento das divisões celulares, pode levar a uma proliferação celular acelerada e, conseqüentemente, à formação de células tumorais (HOSHINA, 2002).

Matsuoka et al. (2001) avaliaram, em células de Hamster chinês (CHL e V79-MZ, com ausência e presença de sistema microssomal S9 (metabolização exógena) os efeitos citotóxicos dos compostos PBTA-1 e PBTA-2, poluentes de água encontrados no rio Nishitakase (Kyoto - Japão), possivelmente derivados dos corantes AZO-DYE 1 (Disperse Blue 301) e AZO-DYE 2 (Disperse Blue 281). Os autores avaliaram também os próprios corantes AZO-DYE 1 e AZO-DYE 2 e os dois intermediários (non-C1PBTA) entre os corantes e os PBTA. Por meio do Índice Mitótico, foi possível verificar que o AZO-DYE 1 teve valores significativos de IM somente para a linhagem V79-MZ (sem S9). O AZO-DYE 2 apresentou inibição da divisão celular para as células CHL e aumento de IM para V-79-MZ (com e sem S9), nas concentrações mais altas testadas. Os intermediários (non-C1PBTA) 1 e 2 não apresentaram potencial citotóxico e os PBTA 1 e 2 induziram alta frequência de IM para as células V79-MZ (sem S9).

Matsuoka et al. (2010) analisaram o IM de células de hamster chinês (CHL) expostas tanto a uma mistura de azocorantes (CMBA), produzida para tingimento têxtil, como para o amianto. Dos resultados obtidos, foi possível verificar que não houve diferença significativa para nenhum dos compostos testados, em relação ao controle negativo, demonstrando que a mistura de azocorantes não foi citotóxica para as células CHL.

2.1.7 Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (CBPI - Cytokinesis-Block Proliferation Index)

O índice CBPI, segundo Lorge et al. (2008) é obtido pela relação entre o número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas observadas e o número total de células contadas por tratamento, como segue:

$$\text{CBPI} = \frac{[1 \times N1] + [2 \times N2] + [3 \times (N3+N4)]}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}}$$

Onde, N1 a N4 corresponde ao número de células com 1 a 4 núcleos, respectivamente. A redução desse índice pode indicar perda de funções e também morte celular (SURRELLÉS et al., 1995; LORGE et al., 2008).

Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1, estudados por Chequer et al. (2009), foram avaliados para diferentes concentrações, por meio do cálculo do CBPI em células HepG2. Os autores observaram que não houve resposta estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle. Porém, foi observado que as concentrações mais elevadas levaram a uma redução no número de células, sugerindo um possível efeito tóxico, embora o CBPI não tenha sido suficientemente sensível para esta detecção.

Ferraz et al. (2013) utilizaram o cálculo do CBPI para determinar a toxicidade celular (HepG2) dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13, após o processo de fotoeletrolise com nanotubos de Ti/TiO₂. Os resultados não apresentaram diferença estatística, quando comparados ao controle negativo. Os autores inferiram, pelas respostas obtidas com o teste, que o tratamento de fotoeletrolise foi efetivo para reduzir o potencial citotóxico dos corantes.

2.1.8 Concentração Inibitória (IC50 - Inhibitory Concentration)

Concentração Inibitória ou IC50 corresponde a concentração de um agente tóxico que promove a inibição de 50% de uma dada fisiologia celular ou do organismo, quando estes são comparados com o grupo controle (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Klemola et al. (2007) estudaram os efeitos de três diferentes corantes têxteis (Drimarene Blue CL-2RL, Drimarene Yellow CL-2R e Drimarene Red CL-5B) e dos extratos aquosos de tecidos tingidos por estes corantes sob queratinócitos humanos (HaCaT). A viabilidade celular foi medida fluorimetricamente pela análise do conteúdo de proteína total presente nas culturas celulares. Pelos resultados obtidos, foi possível concluir que o corante Drimarene Red é muito tóxico para as células, apresentando teores de proteína abaixo de 80% na maioria das

concentrações testadas. Entretanto, de forma geral, todos os corantes foram citotóxicos em concentrações menores do que as utilizadas no processo comercial de tingimento. Ao contrário do resultado para os corantes, os extratos aquosos dos tecidos apresentaram teores de proteína acima de 80%, revelando que não são potencialmente citotóxicos.

Matsuoka et al. (2010) analisaram os potenciais tóxicos de uma mistura de azocorantes (CMBA), produzida para tingimento têxtil, que apresenta uma atividade química semelhante a do amianto, e do próprio amianto, em cultura celular CHL. A avaliação do IC50 se deu por meio da contagem das colônias sobreviventes dos tratamentos, comparadas com as do controle. O potencial citotóxico foi expresso para a concentração em que a sobrevivência das colônias foi de 50% dos valores obtidos no controle. Os resultados do teste com amianto se mostraram muito mais citotóxico que os realizados com o CMBA (cerca de 27 vezes maior).

2.1.9 Concentração Efetiva (EC50 - Effective Concentration)

Concentração efetiva ou EC50, corresponde à concentração de um agente tóxico que causa, após exposição, um efeito agudo (de letalidade ou imobilidade) em 50% dos organismos, quando comparado com o grupo controle. (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Hildenbrand et al. (1999) avaliou o efeito citotóxico do corante Direct Blue 15 (Resacor Blue 2F), após exposição de 72 horas em cultura celular de rim de gambá (linhagem OK) e de duas linhagens de hepatócitos (HepG2 e Chang liver). Este estudo mostra que células de diferentes órgãos (rim e fígado) possuem atividade azoredutase, acumulando 3-3'-dimetoxibenzidina (um produto da redução do azocorante) nas células sobrenadantes, que pode ser verificado por meio de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS). A exposição ao corante resultou em um decréscimo dose-dependente da proliferação celular e em um acúmulo de 3-3'-dimetoxibenzidina, que foram mais evidentes nas células epiteliais de rim do que nas linhagens de hepatócitos. A concentração efetiva (EC50), que é a concentração que reduz a proliferação celular, calculada a partir da curva dose-resposta obtida pela taxa de crescimento/dia foi, pelo menos, 6 vezes mais alta nas linhagens de hepatócitos do que nas células de rim. Apesar da inibição da proliferação celular, os autores concluíram que nem a concentração mais alta testada (250 µg/mL) levou a morte da população celular, visto que o número de células obtidas no final do experimento não foi menor que o encontrado no início do experimento.

2.1.10 Taxa de crescimento relativo

Cameron et al. (1987), analisaram a citotoxicidade de 27 corantes, dentre eles 8 monoazo (Solvent Yellow 3, Solvent Yellow 5, Basic Red 29, Disperse Yellow 3, Solvent Yellow 14, Acid Red 14, Acid Orange 10 e Acid Red 18) e 2 diazo (Direct Blue 6 e Direct Blue 18) utilizados na indústria têxtil, por meio do ensaio de linfoma de camundongo (Mouse Lymphoma Assay), com e sem a fração S9. Os resultados mostraram que, de forma geral, conforme se aumenta a concentração do corante, o crescimento relativo total é reduzido. Esses resultados indicam que esses corantes, quando em altas concentrações, possuem maior potencial citotóxico.

3 GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade pode ser descrita como a capacidade de uma determinada substância ou mistura de substâncias causar danos ao material genético dos organismos expostos, mesmo que estes danos possam ser reparados pelo sistema celular.

Poucos são os estudos de genotoxicidade de azocorantes têxteis realizados com células de mamíferos mantidas em cultura, porém, dentre estes estudos, os ensaios mais utilizados são o do cometa e de aberrações cromossômicas e nucleares.

3.1 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

3.1.1 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa ou “single cell gel electrophoresis” é um teste amplamente utilizado para se avaliar os danos no DNA (LORENZO et al., 2013), por possuir diversas vantagens como: identificar danos no DNA em células isoladas; necessitar de pequena quantidade de células por amostra; ser de fácil aplicação e de baixo custo; pode ser realizado em um curto período de tempo (LIAO et al., 2009); ser uma técnica flexível, podendo ser usada para se avaliar diferentes tipos de dano ao DNA; e ser facilmente adaptável às mais diferentes necessidades experimentais (TICE et al., 2000).

O ensaio do cometa se baseia na eletroforese de células individualizadas em uma matriz de agarose. Após a lise da célula e do desenrolamento do DNA, sob uma corrente elétrica, os fragmentos de DNA migram para o ânodo e, após coloração com corantes fluorescentes, os nucleóides das células portadoras de danos e/ou fragmentos, aparecem na forma de um cometa (RITTER; KNEBEL, 2009). O cometa apresenta uma “cabeça”, composta pelo nucleóide com DNA sem danos, e uma “cauda” que apresenta os fragmentos de DNA. Quanto maior os danos

na molécula de DNA, maior será a cauda do cometa, devido a maior quantidade de fragmentos presentes nesta cauda.

Dentre estes estudos, pode-se citar o de Tsuboy et al. (2007) que avaliaram, por meio de ensaios com células HepG2, a genotoxicidade do azocorante CI Disperse Blue 291, utilizado para tingir fibras de poliéster. Os autores, que testaram cinco concentrações do azocorante (200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL), verificaram que o azocorante foi capaz de promover quebras no DNA das células expostas, sendo que, para as concentrações acima de 400 µg/mL, houve um aumento no tamanho da cauda do cometa em até três vezes o observado para o controle. Neste estudo, foi sugerido que o efeito observado pode ser atribuído, ao menos em parte, a uma ação clastogênica do azocorante.

Ferraz et al. (2011a) avaliaram, pelo ensaio do cometa em HepG2, a capacidade do azocorante Disperse Orange 1 induzir danos ao DNA. Neste estudo, os autores verificaram que as menores concentrações testadas (0,05 e 0,1 µg/mL) não induziram genotoxicidade, mas houve um aumento significativo na migração dos fragmentos de DNA para as demais concentrações testadas (0,2, 0,4, 1, 2 e 4 µg/mL), mostrando a genotoxicidade deste azocorante para as maiores concentrações.

Outros estudos tentam estimar os efeitos genotóxicos causados pelos produtos gerados pela degradação dos azocorantes e compará-los à genotoxicidade dos azocorantes originais. Um exemplo é o estudo de Ferraz et al. (2013), em que os autores avaliaram, pelo ensaio do cometa, a genotoxicidade dos produtos formados pela fotodegradação dos azocorantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1. Os autores observaram que, enquanto os azocorantes originais induziram genotoxicidade em células HepG2, os produtos derivados da fotodegradação não foram mais capazes de induzir danos no DNA dessas células, indicando que o método de fotodegradação foi eficiente para remover a genotoxicidade dos azocorantes. Ainda neste sentido, Oliveira et al. (2010) avaliaram, por meio de ensaios com cultura de células HepG2, a genotoxicidade causada pelos azocorantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, antes e após tratamento com cloro. Os autores observaram que os azocorantes induziram genotoxicidade dose-dependente, mas o índice de danos foi normalmente baixo. Após o tratamento, os azocorantes ainda foram capazes de induzir danos no material genético, embora, o índice de danos tenha sido mais baixo que o inicial. Apesar desta redução na genotoxicidade, os autores sugerem que o tratamento dos azocorantes com cloro não é um método muito eficiente para a remoção da sua toxicidade e que a cloração deve ser usada com muito cuidado.

3.1.2 Teste de aberrações cromossômicas (AC) e nucleares (AN)

O teste de aberrações cromossômicas (AC), realizado com células mantidas em cultura, é utilizado para se detectar a genotoxicidade de diversas substâncias químicas. Segundo Obe et al. (2002), as AC são uma das mais importantes consequências biológicas da exposição a agentes genotóxicos. As AC podem ser definidas como mudanças microscopicamente visíveis nas moléculas do DNA dos cromossomos e das cromátides, mudanças estas capazes de alterar tanto o número como a estrutura dos cromossomos. Além das AC, podem-se também observar alterações na morfologia do núcleo (AN), como presença de brotos nucleares e núcleos lobulados. Estas AN também são utilizadas como indicativos de genotoxicidade.

Matsuoka et al (2001) avaliaram os efeitos de dois compostos derivados da transformação de corantes (PBTA-1 e PBTA-2), de seus possíveis compostos de origem (AZO-DYE 1 – Disperse Blue 301 e AZO-DYE 2 – Disperse Blue 281) e de seus intermediários de degradação (non-C1PBTA), em duas linhagens de células de Hamster chinês (CHL e V79-MZ), na presença e ausência da mistura S9. PBTAs são, segundo Kummrow e Umbuzeiro (2008), compostos genotóxicos formados a partir de azocorantes usados na indústria têxtil, que podem ser gerados durante o próprio processo industrial ou em estações de tratamento de efluentes ou esgotos industriais. Matsuoka et al. (2001) observaram que o AZO-DYE 1 causou uma alta frequência de endoduplicação nas células V79-MZ e o AZO-DYE 2 induziu a formação de núcleos multilobulados nas células CHL e causou condensação da cromatina nas células V79-MZ, indicando que estes AZO-DYEs são capazes de afetar o DNA e as proteínas estruturais e regulatórias envolvidas na divisão celular, principalmente do sistema p53. PBTA-1 induziu aneuploidia e o PBTA-2 induziu poliploidia nas células V79-MZ e uma alta frequência de células binucleadas, sugerindo que esta substância possa atuar como substância que mimetiza a atividade da citocalasina B.

Matsuoka et al. (2010) avaliaram a capacidade de uma mistura de azocorantes (CMBA, mistura de *N*-[5-[(2-cyanoethyl) ethylamino]-4-methoxy-2-[(5-nitro-2,1-benzisothiazol-3-yl)azo]phenyl]acetamide; *N*-[5-[(2-cyanoethyl) amino]-4-methoxy-2-[(5-nitro-2,1-benzisothiazol-3-yl)azo]phenyl] acetamide) induzir AC em uma linhagem celular de pulmão de Hamster chinês (CHL). Os autores observaram que a mistura foi capaz de induzir poliploidia e células polinucleadas, sugerindo que esta pode funcionar como bloqueador da citocinese.

4 MUTAGENICIDADE

Entende-se por mutagenicidade, a capacidade de um determinado composto ou substância induzir mutações e conseqüentemente, aumentar a frequência de mutações de um

organismo. Segundo Umbuzeiro et al. (2005), a atividade mutagênica dos azocorantes depende fortemente de sua estrutura química e, portanto, as respostas mutagênicas destes compostos não podem ser generalizadas pelo grupo inteiro, por isto os autores sugerem que cada corante deve ser individualmente estudado.

Os efeitos mutagênicos dos azocorantes podem ser causados pelo composto original ou por seus metabólitos, como arilaminas ou radicais livres (WEISBURGER, 1997). Um dos critérios utilizados para classificar um corante como perigoso para humanos é sua habilidade de clivagem reductiva e a conseqüente formação de amins aromáticas, quando em contato com o suor ou sucos salivares e gástricos (Pielesz et al., 2002). De acordo com Chequer et al. (2011), após ingestão, os azocorantes podem ser reduzidos pela microflora intestinal ou pelas enzimas hepáticas em amins aromáticas, substâncias estas que apresentam efeitos mutagênicos comprovados.

4.1 ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE

4.1.1 *Ensaio do micronúcleo (MN)*

O ensaio de micronúcleos (MN) tem sido rotineiramente utilizado para detectar a presença de compostos mutagênicos (HARTMANN et al., 2001) e para quantificar o risco mutagênico em diferentes sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo* (MALUF; ERDTMANN, 2000). Os MN são massas de cromatina presentes no citoplasma celular, com a aparência de um pequeno núcleo, que podem ser formados por fragmentos acêntricos ou por perdas cromossômicas, estas últimas devido a disfunções do fuso mitótico (FENECH, 2000), ou ainda pela eliminação do material genético amplificado (FERNANDES et al., 2007; FENECH et al., 2011). MN são caracterizados por seu tamanho, que corresponde de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal, não tendo nenhuma ligação a ele e serem estruturas circulares, com a mesma refringência do núcleo (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste do MN com bloqueio da citocinese (CBMN) é o método mais utilizado para avaliação de MN presentes em cultura de células humanas e/ou de mamíferos. Este método contabiliza e classifica as células que, especificamente, já passaram por um ciclo de divisão celular, após exposição ao químico avaliado (FENECH, 2006).

Chequer et al. (2009) investigaram os efeitos mutagênicos de diferentes concentrações (0,2; 0,4; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL) de dois azocorantes utilizados em processos de coloração têxtil, o Disperse Red 1 e Disperse Orange 1, por meio do ensaio de indução de MN em linfócitos humanos e em uma linhagem celular de fígado humano (HepG2). Nos ensaios com linfócitos,

foi observado que as frequências de MN induzidas pela concentração mais baixa testada de cada corante (0,2 µg/mL) foram similares àsquelas do controle negativo, enquanto que para as concentrações intermediárias (0,4 e 1,0 µg/mL), foi observada uma formação de MN dose-resposta. Nas concentrações mais altas (2,0 e 4,0 µg/mL), foi observado uma redução de MN. Os resultados obtidos com as células HepG2 foram bem similares àqueles observados com células de linfócitos, com a diferença de que o decréscimo na indução de MN foi detectado para as concentrações acima de 4,0 µg/mL. Estes dados comprovam que ambos os azocorantes possuem um potencial mutagênico semelhante, dado pelo aumento de frequências de MN de maneira dose-resposta, tanto nos linfócitos humanos como nas células HepG2. O decréscimo na formação de MN, observado nas maiores dosagens testadas, pode ser devido a uma redução no número de células decorrentes de um possível efeito tóxico dos azocorantes.

Matsuoka et al. (2001) avaliaram o potencial mutagênico de dois compostos (2-fenilbenzotriazóis) *azocorante 1*: 2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)azo]-4-methoxy-5- [bis(2-methoxy-ethyl)amino]acetanilide e *azocorante 2*: 2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)azo]-4-methoxy-5-[N-(2-cyanoethyl)ethylamino]acetanilide), pela aplicação do ensaio de MN em duas linhagens celulares (fibroblastos de hamster Chinês - CHL e V79-MZ), na ausência e presença do sistema S9. Após a exposição das células por 24 horas aos corantes, os pesquisadores avaliaram a indução de células micronucleadas. Os resultados revelaram que o azocorante 1 induziu um aumento de MN dose-resposta dependente para as células CHL, na presença de S9. O azocorante 2 promoveu um aumento de MN nessa mesma linhagem celular, na ausência de S9. Os resultados obtidos pelos ensaios realizados com S9 e sem S9, para o corante 1, indicaram que, após metabolização, este corante apresenta efeito mutagênico, enquanto que o corante 2 tem efeito direto sobre as células CHL. Estes resultados mostraram que tais compostos são capazes de afetar o DNA das células expostas.

O tratamento de efluentes têxteis pelo método convencional, baseado no sistema de lodo ativado seguido de cloração, não é um procedimento totalmente eficaz para a remoção total de azocorantes e, em muitos casos, ele pode até gerar produtos ainda mais mutagênicos que os corantes originais. Para avaliar a efetividade do processo de tratamento de efluente por cloração convencional, Oliveira et al. (2010) aplicaram testes de mutagenicidade (MN) em células HepG2, com soluções aquosas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e o Disperse Red 13. Os autores também verificaram a degradação das moléculas dos corantes, após o tratamento de cloração, por diferentes análises químicas (medidas de espectro de absorção ultravioleta e visível - UV-vis, cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a um detector de díodos - HPLC-DAD, e análise de carbono orgânico total - COT). Pelo ensaio de

CBMN (MN com bloqueio de citocinese), não foi observado quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações testadas dos 3 azocorantes, quando comparado com os resultados do controle negativo, o que comprovou que a atividade mutagênica destes azocorantes foi eliminada, quando estes foram previamente submetidos ao tratamento de cloração química convencional. Apesar das frequências de MN nas células HepG2 terem sido reduzidas, os autores observaram pelas análises químicas que, embora a cloração promovesse a ruptura da ligação azo, não ocorreu a mineralização dos outros centros aromáticos das moléculas estudadas, o que comprovou que a cloração não foi eficiente para promover a total degradação destes azocorantes.

Tsuboy et al. (2007) realizaram um estudo com 5 diferentes concentrações (200; 400; 600; 800 e 1000 µg/mL) do corante comercial CI Disperse Blue 291, que contém o aminoazobenzeno 2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)azo]-5(diethylamino)-4-methoxyacetanilide. Os autores avaliaram o potencial mutagênico destas concentrações na linhagem celular HepG2. Os resultados do estudo mostraram um aumento dose-resposta dependente nas frequências de MN das células de HepG2, quando estas foram expostas pelo período de 24 horas ao azocorante, apresentando valores significativos a partir da concentração de 400 µg/mL. Segundo os autores, o efeito mutagênico do Disperse Blue 291, observado para as células HepG2, pode ser devido ao fato deste composto não requerer clivagem do grupo azo, ou ainda devido a sua redução por esta linhagem celular. Segundo Golka et al. (2004), reações mediadas por enzimas que liberam metabólitos ativos dos azocorantes ocorrem em tecidos de mamíferos, particularmente no fígado, onde estão localizadas diferentes azoredutases. Considerando ainda que a formação dos MN pode ocorrer tanto por quebras cromossômicas como pela disfunção do fuso mitótico, os pesquisadores inferiram que, pelo menos parte da ação do composto testado deve ser atribuída a efeitos clastogênicos (quebras cromossômicas). Os efeitos mutagênicos significativos, observados para as células HepG2 submetidas à exposição ao corante Disperse Blue 291, enfatizam a necessidade do desenvolvimento de corantes não mutagênicos e de investimentos em novos métodos para o tratamento de efluentes, a fim de prevenir os possíveis efeitos deletérios que os azocompostos podem causar nos organismos aquáticos e nos seres humanos.

Ferraz et al. (2013) estudaram a eficiência da fotoeletrocatalise com nanotubos de Ti/TiO₂ para a remoção da toxicidade dos azocorantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1. Os autores utilizaram a fotoeletrocatalise como uma metodologia alternativa para o tratamento de efluentes e água contaminados com esses corantes. A degradação dos compostos foi estimada pela taxa de descoloração e da remoção do COT destes azocorantes. Para a avaliação da mutagenicidade dos produtos da fotoeletrocatalise dos

azocorantes originais, os autores utilizaram o ensaio do MN em células HepG2, para diferentes concentrações dos corantes (0,2; 0,4; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1; e 0,1; 0,2; 0,4; 1,0 e 2,0 µg/mL do corante Disperse Red 13). O método de fotoeletrocatalise mostrou uma rápida descoloração para os 3 corantes testados, além da redução do COT ter sido sempre superior a 87%, após 240 min de tratamento, mostrando que a fotoeletrocatalise é eficiente para promover a degradação e mineralização dos azocorantes. Com relação à atividade mutagênica dos produtos derivados dos corantes, para as células HepG2, comparado com os resultados obtidos em um estudo prévio realizado com os corantes originais (CHEQUER et al., 2009), os autores observaram que os azocorantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 induziram um aumento significativo da frequência de MN nas células HepG2, de maneira dose-dependente. Mas este efeito desapareceu, após a fotoeletrocatalise, indicando que a atividade original dos azocorantes foi completamente removida, pós tratamento fotoeletrocatalítico. Por todos os dados obtidos, os autores concluíram que a fotoeletrocatalise deve ser um método promissor para o tratamento de água contaminadas com corantes têxteis.

Matsuoka et al. (2010) compararam a mutagenicidade de uma mistura de azocorantes (CMBA), produzida para tingimento, que apresenta uma atividade semelhante a de asbestos, com a do asbesto chrysotile B, por meio do uso do ensaio de MN em uma linhagem celular de pulmão de hamster chinês (CHL). A mistura de azocorantes induziu um aumento significativo na frequência de células micronucleadas, após os tratamentos de 24 e 48 horas, semelhante à frequência de MN induzida pelo chrysotile B. Apesar da possibilidade de exposição às fibras de CMBA ser pequena na indústria de tingimento, uma vez que esta mistura é solúvel em metanol e pode ser descartada de forma segura por incineração, ela deve ser cuidadosamente manuseada, quando manufaturada em uma indústria.

O ensaio de MN, aplicado em diversos tipos celulares, é um dos métodos mais usados para avaliação de danos genéticos. Por este teste é possível monitorar populações expostas a compostos químicos diversos (MALUF; ERDTMANN, 2000; FENECH, 2000; SELLAPPA et al., 2010). Sellappa et al. (2010) analisaram o potencial mutagênico de uma mistura de corantes sintéticos de uma indústria de tingimento têxtil do sul da Índia, em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores ocupacionalmente expostos a estes produtos, usando o ensaio de MN com bloqueio de citocinese. Os resultados mostraram um aumento significativo nas frequências de MN dos linfócitos dos trabalhadores expostos, em relação ao controle negativo. Os autores sugerem que esta resposta pode ser decorrente da contínua absorção dos corantes sintéticos, indicando um potencial risco à saúde daqueles trabalhadores. Segundo os autores,

este resultado é concordante com as pesquisas de Mirkova e Lalchev (1990) e Rangunathan et al. (2007), que relacionaram os efeitos mutagênicos observados nos linfócitos de sangue periférico de trabalhadores da indústria têxtil à presença do azocorante benzidina.

4.1.2 *Ensaio de linfoma de camundongos (Mouse Lymphoma Assay - MLA)*

O MLA é um ensaio capaz de avaliar a potencialidade mutagênica e clastogênica de agentes diversos. Este teste quantifica alterações genéticas que afetam a expressão do gene *TK* da enzima timidina quinase (tk), em células L5178Y^{+/-} de linfoma de camundongo. O teste se baseia na perda da heterozigozidade do locus da enzima timidina quinase, quando o gene é afetado por uma substância mutagênica, fazendo com que ocorra resistência das células mutadas à suplementação do meio com trifluorotimidina (TFT). A TFT é um análogo da timina que causa inibição do metabolismo celular, impedindo a divisão celular (LIMA; RIBEIRO, 2003).

Schneider et al. (2004) publicaram um artigo de revisão sobre a mutagenicidade de 281 corantes têxteis em uso em países europeus, enfatizando que há muitas controvérsias entre os dados já publicados e as informações fornecidas pelas indústrias dos corantes. Os autores realizaram uma ampla pesquisa sobre os efeitos mutagênicos de diferentes classes de corantes têxteis, para diversos organismos, observando dados consistentes e contraditórios e, até mesmo, realizando, ensaios laboratoriais (teste de *Salmonella* com as linhagens TA98 e TA100 e o ensaio de linfoma de camundongos - MLA), para corroborar ou não as pesquisas até então realizadas. Os resultados mostraram que dos 53 corantes investigados, pertencentes a diferentes classes químicas, 28% apresentaram efeitos mutagênicos nos testes de *Salmonella*. Para os corantes comprovadamente Ames-positivo foram realizados testes de MLA com a linhagem celular L5178Y TK^{+/-}, utilizando 5 diferentes concentrações dos compostos (de 15,8 a 5000 µg/mL), onde 67% deles apresentaram respostas positivas. Assim, os autores discutem a necessidade de substituição dos diferentes corantes que têm sido utilizados para tingimento têxtil, uma vez que muitos deles possuem um alto potencial mutagênico.

Cameron et al. (1987) avaliaram o potencial mutagênico de 27 corantes têxteis (14 corantes monoazo, 3 corantes diazo, 4 corantes derivados de aminotrifenilmetano e 6 outros diversos corantes), utilizando o ensaio de *Salmonella typhimurium* com as linhagens TA1535, TA1537, TA1538, TA98 e TA100, e o ensaio de linfoma de camundongo (MLA), com a linhagem L5178Y TK^{+/-}, ambos com e sem a mistura exógena S9. Os dados evidenciaram uma boa correlação entre as respostas mutagênicas, positivas ou negativas, apresentadas pelos dois testes (*Salmonella* e o MLA), onde 70% dos compostos testados apresentaram a mesma resposta

em ambos os testes, como os azocorantes: monoazos CI Solvent Yellow 3, CI Basic Red 29, CI Solvent Yellow 14 e o diazo CI Direct Blue 53. Além disso, a maioria dos corantes que induziram efeitos mutagênicos significativos já haviam sido relatados como compostos de potencial carcinogênico, para diferentes organismos, em outras pesquisas realizadas.

Um estudo realizado por Chequer et al. (2011) identificou, por meio de HPLC-DAD (cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a um detector de díodos) e de GC/MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa), os produtos formados pelas oxidação e redução do azocorante Disperse Red 1, simulando o processo de biotransformação. Os autores também avaliaram o potencial mutagênico destes produtos, usando o ensaio de *Salmonella*/microsoma com as linhagens TA98 e YG1041, na ausência do sistema de ativação metabólica exógeno S9, e o ensaio de linfoma de camundongo (MLA), usando o gene Tk (thymidine kinase). Os autores identificaram alguns metabólitos perigosos do Disperse Red 1, como o sulfato 2-[(4-aminophenyl) ethylamino]-ethanol monohydrate; nitrobenzene; 4-nitrobenzamine e 2-(ethylphenylamino)-ethanol, alguns destes, inclusive, considerados carcinogênicos para a espécie humana. Foi observado ainda que, tanto antes como após os processos de oxidação e redução, este azocorante apresentou atividade mutagênica, para o ensaio de *Salmonella*, onde os maiores valores foram registrados para a linhagem YG1041, o que demonstra o envolvimento das enzimas nitroreductase e acetiltransferase no efeito tóxico dos metabólitos do Disperse Red 1. No entanto, nenhuma das diferentes concentrações (0,1; 1,0; 10; 50; 100 e 250 µg/mL) do Disperse Red 1 (original, oxidado ou reduzido) induziu danos mutagênicos significativos para as células de linfoma de camundongos, não sendo possível, então, estabelecer uma relação entre as respostas obtidas nos dois testes realizados. De maneira geral, Chequer et al. (2011) concluíram que o azocorante Disperse Red 1 pode ser metabolizado por enzimas hepáticas, gerando compostos tóxicos, como o nitrobenzeno, que podem contribuir com os efeitos mutagênicos, promovidos por adutos de DNA, conforme observados no ensaio de *Salmonella*. Assim, os autores sugerem que este corante deva ser utilizado com muita cautela e que sejam aplicados tratamentos eficientes de descontaminação dos efluentes e da água potável, para evitar o contato humano e ambiental com este azocorante, devido à sua comprovada geração de produtos mutagênicos, após exposição oral.

Um estudo realizado por Jäger et al. (2004) examinou o potencial mutagênico de diferentes concentrações (de 15,8 a 5000 µg/mL) de corantes têxteis utilizados na União Europeia, por meio do ensaio de mutação reversa bacteriana *Salmonella*/microsoma (teste de Ames). A mutagenicidade de nove produtos de corantes têxteis Ames-positivo foi minuciosamente investigada pelo teste MLA, sendo que 6 deles (67%) induziram efeitos

mutagênicos nesta linhagem celular. Entre os produtos com potencial mutagênico, dois contêm componentes classificados como azocorantes: Bleu Terasil 3R-02 e Eryonil Bordeaux A-5B, sendo que o primeiro apresentou resposta positiva nos testes sem S9 (taxa de indução de 15,2 na concentração de 2500 µg/mL), e o segundo apresentou resposta positiva nos testes com S9 (taxa de indução de 9,5 na concentração de 625 µg/mL). Como o ensaio de MLA permite distinguir colônias grandes de pequenas, as quais são respectivamente associadas à indução de mutações gênicas e de danos cromossômicos (MOORE et al., 1985), foi verificado que o Eryonil Bordeaux A-5B não induziu um aumento nas frequências de mutações para colônias grandes, o que demonstra que este corante é indutor de efeitos mutagênicos para MLA, principalmente, relacionados a mutações cromossômicas. Os autores confirmaram que alguns corantes têxteis disponíveis para uso industrial, que foram abundantemente comercializados, não foram suficientemente testados, devido aos evidentes efeitos mutagênicos observados nos testes realizados *in vitro*. Assim, em resposta aos resultados obtidos, muitas empresas têxteis europeias suspenderam a utilização dos corantes que se mostraram comprovadamente mutagênicos para linhagem celular de mamífero testada e os substituíram por substâncias menos tóxicas.

5 CONCLUSÃO

Observa-se que, pelo amplo uso de azocorantes em atividades humanas, principalmente as relacionadas com a indústria têxtil, ainda são poucos os estudos realizados para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade destes compostos, por meio de ensaios com células de mamíferos mantidas em cultura (teste *in vitro*). A maioria dos trabalhos realizados com estes corantes utiliza o ensaio de *Salmonella*/microsoma, como metodologia de análise. Assim, neste trabalho pode-se concluir que, apesar dos testes realizados com cultura celular serem em número menor que os realizados pelo teste de *Salmonella*/microsoma, os ensaios realizados com cultura celular de mamíferos mostraram ser indicadores importantes para a avaliação da toxicidade ambiental promovida por estes contaminantes, principalmente, por oferecer informações que possam ser mais correlacionadas com seus possíveis efeitos em seres humanos.

Além disso, algumas linhagens celulares, como a HepG2, expressam várias enzimas envolvidas na ativação/detoxificação de carcinógenos reativos ao DNA (MAJER et al., 2004; TSUBOY et al., 2007) bem como, de acordo com Kassie et al. (2003) e Knasmüller et al. (2004), mantêm as atividades de várias enzimas de fase I e II metabolizadoras de drogas, incluindo as acetiltransferases envolvidas na ativação de amins aromáticas formadas a partir de

azocorantes. Ainda, segundo Tsuboy et al. (2007), muitas pesquisas têm demonstrado que a linhagem celular HepG2 reflete melhor as propriedades mutagênicas dos compostos químicos que as bactérias e outras linhagens celulares de mamíferos usadas convencionalmente na rotina dos laboratórios de pesquisa. Desta forma, devem ser realizados mais estudos com cultura de células de mamíferos, para se avaliar os efeitos de azocorantes têxteis. Além disso, também são necessários estudos que visem atenuar a toxicidade destes corantes, para que haja um menor impacto ao ambiente e, conseqüentemente, à saúde dos organismos expostos, bem como aos seres humanos.

Finalmente, como os azocorantes são amplamente utilizados nas indústrias têxteis e apresentam um potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico comprovado por diversos estudos, reforça-se a necessidade de se usar estes corantes com muita cautela, pois esta classe química pode conferir um comprometimento sério aos sistemas hídricos, onde eles são geralmente descartados, assim como, ocasionar ação adversa nos organismos expostos, inclusive no homem, seja pelo contato direto ao corante (via ocupacional ou uso de produtos confeccionados) ou indireto (recursos hídricos contaminados).

Pelos estudos de toxicogenética realizados com corantes, verificou-se que a maioria dos ensaios foram realizados com células humanas metabolizadoras (HepG2), havendo então uma necessidade de mais estudos comparativos realizados com culturas de células humanas, tanto metabolizadoras como não metabolizadoras, para que se possa estimar os possíveis efeitos desses corantes em todos os tipos celulares humanos, e assim, conhecer os reais impactos destes sobre os seres humanos.

Tabela 1

Resumo dos dados de literatura discutidos nesta revisão

Corante	Tratamento	Linagem Celular	Análises	Resultados	Referência
281 corantes têxteis	-	Linforma de camundongo (MLA)	Mutagenicidade em MLA (Mouse Lymphoma Assay)	67% dos corantes Ames-positivo também apresentaram respostas mutagênicas para MLA	Schneider et al., 2004
Acid Orange 10	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente	
Acid Red 14	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente	Cameron et al., 1987
Acid Red 18	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente	
Azo Dye 1 (Disperse Blue 301)	-	Pulmão de hamster chinês (CHL e V79-MZ)	Índice Mitótico, Genotoxicidade, Teste do MN (Micronúcleo)	Citotóxico e genotóxico para a linhagem V79-MZ. Aumento significativo de MN dose-resposta na linhagem CHL (com S9)	Matsuoka et al., 2001
Azo Dye 2 (Disperse Blue 281)	-	CHL e V79-MZ	Índice Mitótico, Genotoxicidade, Teste do MN	Inibição da divisão celular em concentrações mais altas nas células CHL e aumento no IM para a linhagem V79-MZ. Genotóxico para a linhagem V79-MZ. Aumento de MN e células binucleadas com núcleo multilobulado na linhagem CHL (sem S9)	
Basic Red 29	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente. Potencialmente mutagênico	Cameron et al., 1987

Corante	Tratamento	Linhagem Celular	Análises	Resultados	Referência
Benzopurpurina 4B	-	Rim de macaco Rhesus (LLC-MK2)	Viabilidade celular (azul de tripan)	Benzopurpurina 4B, concentração tolerável de 1,38 µmol, cerca de 3 vezes maior que seu composto derivado, <i>o</i> -tolidina (0,47 µmol)	Hahon, 1985
CMBA (mistura de azocorantes)	-	CHL	Citotoxicidade, Aberração Cromossômica e Teste do MN	Sem efeito citotóxico. Genotóxico, promovendo poliploidia e células polinucleadas. Aumento significativo na frequência de MN	Matsuoka et al., 2010
Congo Red	-	LLC-MK2	Viabilidade celular (azul de tripan)	Congo Red, concentração tolerável de 1,43 µmol, cerca de 5 vezes maior que seu composto derivado, benzidina (0,27 µmol)	Hahon, 1985
Direct Blue 15	-	Céls epiteliais de rim de gambá (OK) e 2 linhagens de hepatócitos humanos (HepG2 e Chang liver)	Citotoxicidade (EC 50)	Redução dose-dependente da proliferação celular, porém sem indução de morte celular. As células de rim foram mais afetadas que os hepatócitos	Hildenbrand et al., 1999
Direct Blue 53	-	LLC-MK2	Viabilidade celular (azul de tripan)	Direct Blue 15, concentração tolerável de 5,04 µmol, cerca de 50 vezes maior que seu composto derivado, <i>o</i> -dianisidina (0,10 µmol)	Hahon, 1985
Direct Blue 6	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente. Potencialmente mutagênico	Cameron et al., 1987
Direct Blue 6	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente	Cameron et al., 1987

Corante	Tratamento	Linhagem Celular	Análises	Resultados	Referência
Disperse Blue 291	-	HepG2	Viabilidade celular (laranja de acridina e brometo de etídio), Ensaio do Cometa e Teste do MN	Indução dose-dependente de apoptose e necrose. Genotóxico, principalmente para as concentrações acima de 400 µg/mL. Aumento na frequência de MN em concentrações acima de 400 µg/mL.	Tsuboy et al., 2007
	-	Linfócitos humanos e HepG2	CBPI e Teste do MN	Sem efeito citotóxico, mas com redução no número de células nas concentrações mais elevadas. Aumento nas frequências de MN dose-resposta	Chequer et al., 2009
	-	HepG2	Viabilidade celular (íodeto de propídio/anexina V), Ensaio do Cometa	Indução de apoptose após 72 horas de exposição. Genotóxico para as concentrações (0,2; 0,4; 1; 2 e 4 µg/mL)	Ferraz et al., 2011 ^a
Disperse Orange 1	-	HepG2	Citotoxicidade (Teste do MTT e Teste CCK-8)	Redução da atividade mitocondrial apenas na cultura monocamada	Ferraz et al., 2012
	Fotoeletrolise	HepG2	Viabilidade celular (íodeto de propídio/anexina V), CBPI, Ensaio do Cometa e Teste do MN	Após fotoeletrolise, não apresentou citotoxicidade, nem genotoxicidade, nem mutagenicidade	Ferraz et al., 2013
Disperse Red 1	Cloração	HepG2	Ensaio do Cometa e Teste do MN	Após o tratamento, indução de genotoxicidade dose-dependente, porém em valores mais baixos e redução da frequência de MN	Oliveira et al., 2010
	-	Linfócitos humanos e HepG2	CBPI e Teste do MN	Sem efeito citotóxico, mas com redução no número de células nas concentrações mais elevadas. Aumento nas frequências de MN dose-resposta	Chequer et al., 2009
	-	HepG2	Citotoxicidade (Teste do MTT e Teste CCK-8)	Redução da atividade mitocondrial em cultura monocamada e 3D	Ferraz et al., 2012
-	-	HepG2	Viabilidade celular (íodeto de propídio/anexina V)	Não apresentou citotoxicidade	Ferraz et al., 2011b

Corante	Tratamento	Linhagem Celular	Análises	Resultados	Referência
	Fotoeletrolise	HepG2	Viabilidade celular (íodeto de propídio/anexina V), CBPI, Ensaio do Cometa e Teste do MN	Após fotoeletrolise, não apresentou citotoxicidade, nem genotoxicidade, nem mutagenicidade	Ferraz et al., 2013
Disperse Red 1	Cloração	HepG2	Ensaio do Cometa e Teste do MN	Após o tratamento, indução de genotoxicidade dose-dependente, porém em valores mais baixos e redução da frequência de MN	Oliveira et al., 2010
	Biotransformação hepática	MLA	Mutagenicidade em MLA	Nenhuma das concentrações (0,1; 1,0; 10; 50; 100 e 250 µg/ml) do Disperse Red 1 (original, oxidado ou reduzido) induziu danos mutagênicos significativos	Chequer et al., 2011
	-	HepG2	Citotoxicidade (Teste do MTT e Teste CCK-8)	Elevada redução da atividade mitocondrial e da enzima desidrogenase	Ferraz et al., 2012
	-	HepG2	Viabilidade celular (íodeto de propídio/anexina V)	Não apresentou citotoxicidade	Ferraz et al., 2011b
Disperse Red 13	Fotoeletrolise	HepG2	Viabilidade celular (íodeto de propídio/anexina V), CBPI, Ensaio do Cometa e Teste do MN	Após fotoeletrolise, não apresentou citotoxicidade, nem genotoxicidade, nem mutagenicidade	Ferraz et al., 2013
	Cloração	HepG2	Ensaio do Cometa e Teste do MN	Após o tratamento, indução de genotoxicidade dose-dependente, porém em valores mais baixos e redução da frequência de MN	Oliveira et al., 2010
Disperse Yellow 3	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente	Cameron et al., 1987
Drimarene Blue	-	Queratinócito humano (HaCat)	Citotoxicidade (IC 50)	Citotóxico em concentrações menores que as utilizadas no processo de tingimento	Klemola et al., 2007

Corante	Tratamento	Linagem Celular	Análises	Resultados	Referência
Drimarene Blue (extrato de tecido)	-	HaCat	Citotoxicidade (IC 50)	Extrato de tecido corado não apresentou potencial citotóxico	
Drimarene Red	-	HaCat	Citotoxicidade (IC 50)	Muito tóxico às células, mesmo quando testado em concentrações mais baixas. Citotóxico em concentrações menores que as utilizadas no processo de tingimento	
Drimarene Red (extrato de tecido)	-	HaCat	Citotoxicidade (IC 50)	Extrato de tecido corado não apresentou potencial citotóxico	Klemola et al., 2007
Drimarene Yellow	-	HaCat	Citotoxicidade (IC 50)	Citotóxico em concentrações menores que as utilizadas no processo de tingimento	
Drimarene Yellow (extrato de tecido)	-	HaCat	Citotoxicidade (IC 50)	Extrato de tecido corado não apresentou potencial citotóxico	
Indústria Têxtil (trabalhadores expostos)	-	Linfócitos de sangue	Teste do MN (cultura de linfócitos)	Aumento significativo nas frequências de MN dos linfócitos dos trabalhadores expostos	Sellappa et al., 2010
PBTA-1	-	CHL e V79-MZ	Índice Mitótico e Genotoxicidade	Alta frequência no IM nas células V79-MZ. Genotóxico para a linhagem V79-MZ	Matsuoka et al., 2001
PBTA-2	-	CHL e V79-MZ	Índice Mitótico e Genotoxicidade	Alta frequência no IM nas células V79-MZ. Genotóxico para a linhagem V79-MZ	
Remazol Black 5	Ozonização	Hepatoma de rato (H4-IIIE)	Viabilidade celular (vermelho neutro)	Aumento da citotoxicidade nos primeiros 120 minutos de ozonização. Após esse tempo, redução do efeito citotóxico do corante	Wang et al., 2003

Corante	Tratamento	Linhagem Celular	Análises	Resultados	Referência
Solvent Yellow 14	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente. Potencialmente mutagênico	
Solvent Yellow 3	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente. Potencialmente mutagênico	Cameron et al., 1987
Solvent Yellow 5	-	MLA	Citotoxicidade (crescimento total relativo) e Mutagenicidade em MLA	Redução do crescimento total relativo de forma dose-dependente	
Vários corantes têxteis	-	MLA	Mutagenicidade em MLA	Dois azocorantes - Bleu Terasil 3R-02 e Eryonil Bordeaux A-5B - dentre 9 corantes têxteis Ames-positivos também induziram efeitos mutagênicos para MLA	Jäger et al., 2004

- Teste realizado com substância pura.

6 REFERÊNCIAS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121–135, 1995.

CAMERON, T. P.; HUGHES, T. J.; KIRBY, P. E.; FUNG, V. A.; DUNKEL, V. C. Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the salmonella/microsome and mouse lymphoma TK+/- assays. **Mutation Research**, v. 189, n. 3, p. 223–61, 1987.

CARLIELL, C. M.; BARCLAY, S. J.; NAIDOO, N.; et al. Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water S.A.**, v. 21, n. 1, p. 61–69, 1995.

CARVALHO, T. U.; Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de Estudo da Célula**. 4 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996. p. 45-58.

CHEQUER, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; et al. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 676, n. 1-2, p. 83–6, 2009.

CHEQUER, F. M. D.; LIZIER, T. M.; FELÍCIO, R. DE; et al. Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye Disperse Red 1. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 8, p. 2054–63, 2011.

CHUNG, K. T.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 3, p. 201–220, 1992.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, n. 13, p. 1259–1264, 1996.

CLARKE, E. A.; ANKILER, R. Organic dyes and pigments. In: HUTZINGER, O. (Org.). **The Handbook of Environmental Chemistry**. New York: Springer, 1980. vol. 3, Part A.

DOJINDO. **Cell Counting Kit-8**, 2013. Manual Técnico, Dojindo Molecular Technologies, Inc. Disponível em: < <http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx> >. Acesso em: 10 nov 2013.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 58–66, 2006.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–32, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERRAZ, E. R.A.; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 2, p. 628–633, 2011a.

FERRAZ, E. R A; UMBUZEIRO, G. A.; ALMEIDA, G.; et al. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 5, p. 489–97, 2011b.

FERRAZ, E. R. A.; LI, Z.; BOUBRIAK, O.; OLIVEIRA, D. P. Hepatotoxicity assessment of the azo dyes disperse orange 1 (DO1), disperse red 1 (DR1) and disperse red 13 (DR13) in HEPG2 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 75, n. 16-17, p. 991–9, 2012.

FERRAZ, E. R. A.; OLIVEIRA, G. A. R.; GRANDO, M. D.; et al. Photoelectrocatalysis based on Ti/TiO₂ nanotubes removes toxic properties of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1 from aqueous chloride samples. **Journal of Environmental Management**, v. 124, p. 108–14, 2013.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 1170 p.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v. 151, n. 1, p. 203–10, 2004.

HAHON, N. Inhibition of viral interferon induction in mammalian cell cultures by azo dyes and derivatives activated with rat liver S9 fraction. **Environmental Research**, v. 37, n. 1, p. 228–38, 1985.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 843–58, 2001.

HILDENBRAND, S.; SCHMAHL, F.W.; WODARZ, R.; KIMMEL, R.; DARTSCH, P. C. Azo dyes and carcinogenic aromatic amines in cell cultures. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 72, n. 3, p. M52-M56, 1999.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. 52 f. Trabalho de conclusão do curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, p. 520–522, 1994.

HUNGER, K. **Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. 660 p.

JÄGER, I.; HAFNER, C.; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, v. 561, n. 1-2, p. 35–44, 2004.

KASSIE, F.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; EDENHARDER, R.; et al. Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 183–92, 2003.

KLEMOLA, K.; PEARSON, J.; LIESIVUORI, J.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. Evaluating the toxicity of fabric extracts using the hepa-1 cytotoxicity test, the HaCaT cytotoxicity test and the spermatozoa motility inhibition test. **Journal of the Textile Institute**, v. 100, n. 4, p. 330–337, 2009.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 315–28, 2004.

KUMMROW, F.; UMBUZEIRO, G. A. 2-fenilbenzotriazóis (PBTA): uma nova classe de contaminantes ambientais. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 401–406, 2008.

LIAO, W.; McNUTT, M. A.; ZHU, W.-G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46–53, 2009.

LIMA, P. L. A.; RIBEIRO, L. R. Teste de mutação gênica em células de mamífero (*mouse lymphoma assay*). In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 201-223.

LORENZO, Y.; COSTA, S.; COLLINS, A. R.; AZQUETA, A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, n. 4, p. 427–32, 2013.

LORGE, E.; HAYASHI, M.; ALBERTINI, S.; KIRKLAND, D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects. **Mutation Research**, v. 655, n. 1-2, p. 1–3, 2008.

MAJER, B. J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; et al. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, n. 1-2, p. 153–66, 2004.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Evaluation of occupational genotoxic risk in a Brazilian hospital. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 485–488, 2000.

MATSUOKA, A.; MATSUDA, Y.; KANIWA, M. Needle fibers of an azo-dye mixture induce polyploidy in a Chinese hamster cell line CHL. **Bulletin of National Institute of Health Sciences**, n. 128, p. 65–70, 2010.

MATSUOKA, A.; TADA, A.; TERAOKA, Y.; et al. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (azo dyes) and

intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. **Mutation Research**, v. 493, n. 1-2, p. 75–85, 2001.

MIRKOVA, E. T.; LALCHEV, S. G. The genetic toxicity of the human carcinogens benzidine and benzidine-based dyes: chromosomal analysis in exposed workers. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 340, p. 397–405, 1990.

MISHELL, B. B.; SHIIGI, S. M. **Selected Methods in Cellular Immunology**. San Francisco: Freeman and Company, 1980. 486 p.

MOORE, M. M.; CLIVE, D.; HOZIER, J. C.; et al. Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, v. 151, n. 1, p. 161–74, 1985.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, n. 1-2, p. 17–36, 2002.

OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CHEQUER, F. M. D.; 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**, v. 703, n. 2, p. 200–8, 2010.

PIELESZ, A.; BARANOWSKA, I.; RYBAKT, A.; WŁOCHOWICZ, A. Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 1, p. 42–7, 2002.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Orgs.). **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 59-75.

RAGUNATHAN, I.; PALANIKUMAR, L.; PANNEERSELVAM, N. Cytogenetic studies on the peripheral lymphocytes of occupationally exposed textile dye industry workers. **Facta Universitatis**, v. 14, n. 1, p. 43–46, 2007.

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

RITTER, D.; KNEBEL, J. Genotoxicity testing in vitro - development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. **Toxicology in vitro**, v. 23, n. 8, p. 1570–5, 2009.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

SCHNEIDER, K.; HAFNER, C.; JÄGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 83–91, 2004.

SELLAPPA, S.; PRATHYUMNAN, S.; JOSEPH, S.; KEYAN, K. S.; BALACHANDAR, V. Genotoxic effects of textile printing dye exposed workers in India detected by micronucleus assay. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 11, n. 4, p. 919–922, 2010.

SURRALLÉS, J.; XAMENA, N.; CREUS, A.; et al. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 341, n. 3, p. 169–184, 1995.

TAKAHASHI, A.; MATSUMOTO, H.; YUKI, K.; et al. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 60, n. 2, p. 591–597, 2004.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; et al. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1650–1655, 2007.

UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H.; WARREN, S. H.; et al. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 49–56, 2005.

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

VAN DER ZEE, F. P. **Anaerobic dye reduction**. 2002. 142 f. Thesis (PhD in Environmental Technology) – Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Wageningen, Wageningen, 2002.

VENTURA-CAMARGO, B. C.; MARIN-MORALES, M. A. Azo Dyes: Characterization and Toxicity – A Review. **Textiles and Light Industrial Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 85–103, 2013.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 1995.

WANG, C.; YEDILER, A.; LIENERT, D.; WANG, Z.; KETTRUP, A. Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1225–32, 2003.

WEISBURGER, J. H. A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health. **Mutation Research**, v. 376, n. 1-2, p. 261–6, 1997.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 464 p.

ZBAIDA, S. The mechanism of microsomal azoreduction: predictions based on electronic aspects of structure-activity relationships. **Drug Metabolism Reviews**, v. 27, n. 3, p. 497–516, 1995.

5.2 Teste do MTT

O teste do MTT foi um dos testes utilizados para definir as concentrações não tóxicas do corante Acid Red 114. Este ensaio foi realizado, em duplicata, expondo as células HepG2 às diferentes concentrações do corante, por um período de exposição de 3 horas. As placas foram lidas em espectrofotômetro cujos dados obtidos foram transformados em porcentagem de viabilidade, dispostos na Tabela 1. A viabilidade dos diversos tratamentos foram obtidos por cálculos percentuais comparativos entre os valores dos tratamentos e os do CN, onde o valor de CN foi considerado como 100%.

Segundo Mosmann (1983), quanto maior a quantidade de formazano gerada, maior é a quantidade de células viáveis. Sendo assim, a viabilidade celular pode ser quantificada pela redução do MTT a formazan, por meio da atividade metabólica mitocondrial das células. Portanto, os valores de viabilidade estão diretamente relacionados aos valores de absorbância obtidos pelo espectrofotômetro. Desta forma, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se dizer que as menores concentrações do corante Acid Red 114 são menos tóxicas para as células, devido a maior viabilidade celular observada. Porém, de forma geral, todas as concentrações testadas do corante indicaram valores superiores aos do CN, mostrando que o próprio corante interferiu na leitura de absorbância pelo espectrofotômetro, mesmo após diversas lavagens para retirada do corante, o que tornou este teste ineficiente para a avaliação da citotoxicidade do Acid Red 114.

As concentrações de 2500 µg/ml e 250 µg/ml não foram apresentadas na Tabela 1, porque seus valores excederam a capacidade de leitura do aparelho.

Tabela 1. Porcentagens de viabilidade das células HepG2, obtidas no teste do MTT, após exposição por 3 horas em diferentes concentrações do corante Acid Red 114.

Tratamentos	Duplicata 1	Duplicata 2
CN	100,00±0	100,00±0
CP	19,45±10,72	19,96±6,04
125 µg/ml	107,53±30,57	92,59±27,15
50 µg/ml	108,29±29,45	91,38±28,53
25 µg/ml	117,31±27,60	148,02±27,84
2,5 µg/ml	150,99±48,65	170,36±47,10
0,25 µg/ml	144,88±30,89	187,55±45,47
0,025 µg/ml	155,00±30,07	208,12±64,98

Valores expressos em Média±Desvio Padrão. CN = controle negativo (meio de cultura sem soro); CP = controle positivo (Triton X-100, 1%).

5.3 Teste de viabilidade com Azul de Tripan

O teste de viabilidade com o corante Azul de Tripan também é um teste utilizado para avaliação da viabilidade celular (Mishell; Shiigi, 1980), por isso, foi utilizado neste trabalho para definir as concentrações não tóxicas do corante Acid Red 114, em substituição ao teste do MTT.

O teste de exclusão do corante azul de tripan consiste na avaliação da integridade da membrana. Quando as membranas estão íntegras não há interação entre a célula e o azul de tripan, pois este só atravessa a membrana se esta estiver danificada. Assim, células viáveis são impermeáveis ao corante, enquanto que células mortas (inviáveis) se tornam permeáveis a ele, passando a ter a coloração azulada (Freshney, 2005).

Após a exposição da solução celular ao azul de tripan, foram contadas as células viáveis, cujos resultados foram transformados em porcentagem, como disposto na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de viabilidade celular da linhagem HepG2, obtida pelo teste de exclusão do corante azul de tripan, após exposição por 3 e 24 horas às diferentes concentrações do corante Acid Red 114.

Tratamentos	Tempo de Exposição			
	3 horas		24 horas	
	R1	R2	R1	R2
CN	97,56	95,68	98,75	96,97
CP	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*
2500 µg/ml	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*
250 µg/ml	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*
125 µg/ml	75,00*	90,23	50,00*	91,67
50 µg/ml	93,94	91,71	83,75	78,72*
25 µg/ml	95,54	96,80	90,16	91,47
2,5 µg/ml	95,77	97,96	95,65	90,00
0,25 µg/ml	98,05	97,60	95,29	97,11
0,025 µg/ml	98,28	98,07	92,90	90,51

Valores expressos em porcentagem. CN = controle negativo (meio de cultura sem soro); CP = controle positivo (Triton X-100, 1%); R1 = réplica 1; R2 = réplica 2. *Viabilidade menor que 80%.

De acordo com os resultados obtidos, as concentrações de 2500 µg/mL; 250 µg/mL e 125 µg/mL foram as mais tóxicas para as células. Além da baixa % de viabilidade celular registrada para essas concentrações, também foi observado efeito tóxico pela redução do número ou pela ausência de células no meio, sendo possível registrar apenas fragmentos celulares. Estes resultados se mostraram equivalentes para os dois tempos diferentes de exposição (3 e 24 horas). As demais concentrações, por apresentarem, na sua maioria, valores de viabilidade superiores a 80%, foram selecionadas para a realização dos bioensaios subsequentes.

Com relação ao tempo de exposição, o tratamento realizado por 24 horas se mostrou mais citotóxico que o realizado por 3 horas. De forma geral, também foi observada uma redução no número total de células e um decréscimo na viabilidade das mesmas, quando estas ficavam expostas por mais tempo ao corante.

A partir dos resultados obtidos nos testes com o corante azul de tripan, ficaram estabelecidas, para a realização dos bioensaios com cultura celular, as concentrações de 50 µg/mL; 25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,025 µg/mL e o tempo de exposição de 3 horas nestas concentrações.

5.4 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado com o corante antes da biodegradação, nas concentrações obtidas pelo teste de viabilidade com azul de tripan (50 µg/mL; 25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,025 µg/mL) e após o processo de biodegradação, com os biodegradados B1 e B2, que foram obtidos por 2 inóculos diferentes. Pela análise das lâminas em microscopia de fluorescência, foram obtidos os resultados expressos nas Tabelas 3 e 4, que, respectivamente, representam os dados antes e após a biodegradação. A representação da classe de danos, segue representada na Figura 3.

Tabela 3. Distribuição das diferentes classes de danos e escores do ensaio do cometa em células HepG2 expostas, por 3 horas, às diferentes concentrações do corante Acid Red 114.

Tratamentos	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore de Danos
CN	33,67±10,67	51,67±7,02	14,00±3,61	0,67±0,58	81,67±14,57
CP	0,00±0,00	29,67±5,69	40,00±7,00	30,33±10,12	200,67±14,84*
50 µg/mL	0,00±0,00	18,33±6,51	54,33±6,03	27,33±0,58	209,00±7,00*
25 µg/mL	0,00±0,00	16,00±6,08	33,33±9,87	50,67±15,95	234,67±22,03*
2,5 µg/mL	0,33±0,58	16,00±3,00	46,67±9,71	37,00±9,54	220,33±10,21*
0,25 µg/mL	0,33±0,58	14,33±4,93	34,00±6,08	51,33±9,02	236,33±12,66*
0,025 µg/mL	1,33±1,53	16,00±1,73	36,00±4,58	46,67±2,31	228,00±3,00*

Valores expressos em Média±Desvio Padrão. CN = controle negativo (PBS); CP = controle positivo (MMS 4x10⁻⁴M). *Valor estatisticamente significativo em relação ao CN (p<0,05), de acordo com ANOVA/Dunnet.

Figura 3. Nucleóides de células HepG2, expostas por 3 horas às diferentes concentrações do corante Acid Red 114 e aos seus biodegradados, após o ensaio do cometa. A. Classe 0; B. Classe 1; C. Classe 2; D. Classe 3.

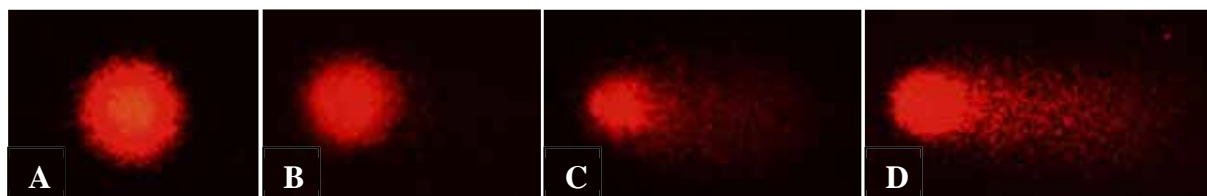


Tabela 4. Distribuição das diferentes classes de danos e escores do ensaio do cometa em células HepG2 expostas, por 3 horas, aos biodegradados B1 e B2.

Tratamentos	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore de Danos
CN	24,67±2,89	72±4	3,33±4,93	0±0	78,67±7,02
CP	1±1,73	55,33±16,17	41,67±19,01	3±1,73	147,67±17,56*
Cmeio	10±8,19	69±6,24	20,67±4,04	0±0	110,33±10,69
B1	0±0	5,33±4,04	50,67±12,66	44±15,87	238,67±19,40*
B2	0±0	41,67±12,74	51±7	7,33±5,77	165,67±18,5*

Valores expressos em Média±Desvio Padrão. CN = controle negativo (PBS); CP = controle positivo (MMS 4×10^{-4} M); Cmeio = controle do meio mineral utilizado na biodegradação; B1 = corante Acid Red 114 (100 µg/mL) após biodegradação por inóculo 1; B2 = corante Acid Red 114 (100 µg/mL) após biodegradação por inóculo 2. *Valor estatisticamente significativo em relação ao CN ($p < 0,05$), de acordo com ANOVA/Dunnet.

Os escores de cada tratamento, em ambos os ensaios, foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, para comparação de danos entre os tratamentos e o CN.

No ensaio para avaliação do corante antes da biodegradação, todas as concentrações testadas na linhagem HepG2 mostraram-se estatisticamente significativas em relação ao CN. Pelos valores de score apresentados na tabela 3, pode-se inferir que o corante Acid Red 114 é potencialmente genotóxico, mesmo quando utilizado em baixas concentrações (concentração mínima testada = 0,025 µg/mL).

As amostras B1 e B2, obtidas após o processo de biodegradação, também foram estatisticamente significativas, mostrando que mesmo após a biodegradação por bactérias, os compostos gerados também possuem atividade genotóxica. Embora as duas amostras tenham apresentado potencial genotóxico, os valores de escore para amostra B1 foram muito próximos aos valores obtidos com corante sem biodegradação (Tabela 3), mostrando que não houve redução da atividade genotóxica inicial. A amostra B2, teve seus escores um pouco mais reduzidos que os escores do corante sem biodegradação, se mostrando mais eficaz que a amostra B1, embora seus valores ainda sejam mais elevados que os do CN.

O meio mineral utilizado para a montagem do ensaio de biodegradação foi analisado (Cmeio), quanto ao seu potencial genotóxico e quanto às possíveis interferências nos resultados finais. Contudo, o meio não se mostrou estatisticamente significativo, quando comparado ao CN, eliminando a possibilidade de que tais efeitos estejam relacionados ao meio mineral.

5.5 Teste do Micronúcleo (MN)

O teste do MN foi utilizado para avaliar o potencial mutagênico do corante Acid Red 114, antes e após o processo de biodegradação. Para o ensaio com o corante antes da biodegradação, foram usadas as concentrações obtidas pelo teste de viabilidade com azul de tripan (50 µg/mL; 25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 0,25 µg/mL e 0,025 µg/mL) e, para o ensaio após a biodegradação, foram usados os biodegradados B1 e B2. Após análise em microscopia de luz, foram obtidos os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6, que representam os dados antes e após a biodegradação, respectivamente. As células binucleadas normais e portadoras de MN, broto nuclear ou ponte nucleoplasmática, seguem representadas na Figura 4.

Tabela 5. Resultados do teste do MN realizado com células HepG2 expostas, por 3 horas, às diferentes concentrações do corante Acid Red 114.

Tratamentos	MN	Broto	Ponte
CN	42,20±4,27	31,60±4,79	16,60±5,56
CP	85,70±4,51*	49,70±8,02*	31,70±4,04*
50 µg/mL	66,00±10,10*	50,00±6,24*	7,67±2,08
25 µg/mL	51,30±4,16	38,40±2,51	7,63±2,37
2,5 µg/mL	65,70±10,20*	46,00±3,00*	8,33±2,08
0,25 µg/mL	54,30±5,86	36,30±3,51	8,00±1,00
0,025 µg/mL	68,30±17,80*	53,00±7,21*	17,00±5,29

Valores expressos em Média±Desvio Padrão. CN = controle negativo (PBS); CP = controle positivo (MMS 4x10⁻²M). *Valor estatisticamente significativo em relação ao CN (p<0,05), de acordo com ANOVA/Dunnet.

Figura 4. Células binucleadas de HepG2, após exposição por 3 horas às diferentes concentrações do corante Acid Red 114 e aos seus biodegradados. A. Célula binucleada normal; B. Célula binucleada com broto; C. Célula binucleada com ponte nucleoplasmática; D. Célula binucleada com micronúcleo.

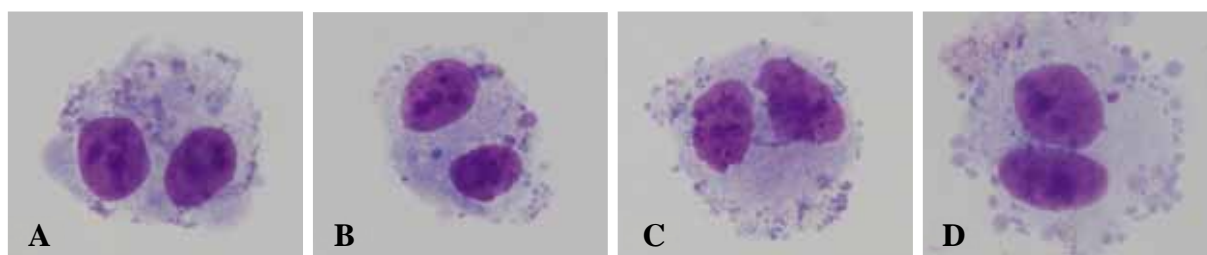


Tabela 6. Resultados do teste do MN realizado com células HepG2 expostas, por 3 horas, aos biodegradados B1 e B2.

Tratamentos	MN	Broto	Ponte
CN	38,67±1,53	34,00±4,36	4,67±0,58
CP	62,00±10,44*	45,00±6,24	17,00±3,00*
Cmeio	49,67±3,21	49,33±4,04	4,67±3,79
B1	51,67±1,15*	46,67±9,07	4,00±1,73
B2	46,67±3,79	47,00±4,36	3,67±4,04

Valores expressos em Média±Desvio Padrão. CN = controle negativo (PBS); CP = controle positivo (MMS 4×10^{-2} M); Cmeio = controle do meio mineral utilizado na biodegradação; B1 = corante Acid Red 114 (100 µg/mL) após biodegradação por inóculo 1; B2 = corante Acid Red 114 (100 µg/mL) após biodegradação por inóculo 2. *Valor estatisticamente significativo em relação ao CN ($p < 0,05$), de acordo com ANOVA/Dunnet.

A formação de MN está relacionada com a perda de cromossomos inteiros ou a fragmentos cromossômicos, que não foram incorporados ao núcleo principal da célula-filha. Esses parâmetros são usados, então, como um indicativos de atividades aneugênicas e clastogênicas, respectivamente (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Pelos dados de MN apresentados na Tabela 5, referentes ao corante antes da biodegradação, é possível verificar que a maioria das concentrações testadas foram estatisticamente significativas, quando comparadas ao CN. Apesar das concentrações 25 µg/ml e 0,25 µg/mL não terem apresentado resultados significativos, os valores de MN foram superiores aos encontrados no CN, indicando assim, uma possível mutagenicidade do corante em estudo.

Após o processo de biodegradação, a amostra B1 ainda se mostrou mutagênica, indicando que os produtos gerados pelo processo não reduziu a mutagenicidade do corante. No entanto, a amostra B2, não se mostrou estatisticamente significativa, mesmo apresentando valores acima aos do CN.

Foi realizado também um controle do meio mineral (Cmeio), utilizado na montagem do ensaio de biodegradação, para a verificação do seu potencial mutagênico. Apesar dos valores de MN terem sido superiores aos do CN, o meio não se mostrou estatisticamente significativo, indicando não ser potencialmente mutagênico.

Outro parâmetro avaliado foram as anormalidades nucleares (AN), no qual estão inseridos os brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas. Os mecanismos de formação das AN não são totalmente conhecidos, porém vários estudos sugerem que estas alterações ocorram em

resposta à exposição das células à agentes genotóxicos (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001). Muitos estudos vem associando essas AN aos ensaios de MN (CAVAS; ERGENE-GÖZÜRAKA, 2005).

As pontes ocorrem quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos ou de cromátides são puxados para pólos opostos durante a anáfase (FENECH; CROTT, 2002; FENECH, 2003). Segundo Fenech et al. (2003), as pontes são algumas vezes observadas após exposição à agentes clastogênicos. De acordo com Lindberg et al. (2007), os brotos nucleares podem ser formados por diferentes mecanismos, dentre eles, quatro já propostos, sendo dois deles, com ocorrência durante a divisão celular, que pode ocorrer por atrasos na anáfase ou por quebras de pontes na anáfase, enquanto que os outros dois postulam a formação do broto durante a fase S, seja por extrusão do núcleo de material amplificado ou mesmo por falha na replicação da cromatina. De acordo com Fenech et al. (2003), a inclusão desses marcadores de danos cromossômicos ao teste do MN, podem auxiliar para uma melhor avaliação do potencial de toxicidade do agente avaliado.

Pelos dados apresentados na Tabela 5 (corante antes da biodegradação), pode-se observar que a presença de pontes nucleoplasmáticas não foi um *endpoint* tão evidente, porém, a maioria das concentrações se mostraram sigficativamente diferentes, quando comparadas com as contagem de brotos nucleares. Estes dados podem ser considerados como um indicativo de atividade genotóxica, ação esta que pode ser reforçada pelos resultados registrados no ensaio do cometa.

Os resultados obtidos com as amostras biodegradadas B1 e B2 (Tabela 6), não apresentaram valores sigficativos para nenhuma das AN, não indicando atividade genotóxica para nenhuma das amostras. Estes resultados não foram concordantes com o ensaio do cometa, visto que nesse último ensaio as duas amostras apresentaram-se genotóxicas, embora a amostra B2 tenha mostrado uma redução no escore de danos, com relação ao controle.

5.6 Teste de *Salmonella*/microsoma – Protocolo de Pré-incubação

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam os resultados obtidos no teste de *Salmonella*/microsoma, realizado com o corante Acid Red 114, antes e após o processo de biodegradação. Para o ensaio com o corante em sua forma original (Tabela 7), foram utilizadas as concentrações obtidas no teste de viabilidade celular com azul de tripan, com o acréscimo de mais uma concentração superior às demais (125 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 0,25 µg/ml e 0,025 µg/ml). Nos ensaios realizados com os biodegradados do corante, foram utilizadas a concentração inicial de

50 µg/ml e as diluições desta concentração em meio mineral (10, 100, 1000 e 10000 vezes) (Tabela 8 - B1; Tabela 9 - B2).

Tabela 7. Resultado do teste de mutagenicidade realizado com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurim* expostas às diferentes concentrações do corante Acid Red 114.

Linhagem	Concentração (µg/mL)	Revertentes (Média±DP)	Previsão Linear	Valor de p (ANOVA)	Valor de p (Bernstein)	Slope
TA98 +S9	0	16,50±14,85	17,72	0,341	0,441	0,009515
	0,025	1,33±1,53				
	0,25	31,67±4,16	17,73			
	2,5	17,67±13,43	17,75			
	25	11,00±4,24	17,96			
	50	26,67±8,14	18,20			
	125	19,00±7,07	18,91			
TA98 -S9	0	17,60±14,33	16,52	0,23	0,372	0,017608
	0,025	32,33±4,16	16,52			
	0,25	28,67±14,19	16,53			
	2,5	12,00±7,55	16,57			
	25	13,50±2,12	16,96			
	50	13,67±1,53	17,40			
	125	23,33±3,21	18,72			
TA100 +S9	0	91,50±12,02	102,30	0,703	0,74	-0,05145
	0,025	99,67±3,06	102,30			
	0,25	102,00±28,93	102,29			
	2,5	116,33±14,47	102,17			
	25	102,33±16,26	101,02			
	50	97,50±6,36	99,73			
	125	96,00±7,00	95,87			
TA100 -S9	0	115,20±28,53	132,43	0,071	0,06	0,154269
	0,025	156,00±3,00	132,43			
	0,25	136,00±9,54	132,47			
	2,5	134,00±17,44	132,81			
	25	148,33±10,12	136,28			
	50	148,67±4,04	140,14			
	125	146,00±6,56	151,71			

Médias do Controle positivo –S9: 4NQO (0,05µg/µL): 101,50 (TA98) e 566,00 (TA100); +S9: 2AA (0,25 µg/µL): 521,00 (TA98) e 1721,00 (TA100).

Tabela 8. Resultado do teste de mutagenicidade realizado com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurim* com o biodegradado (B1) do corante Acid Red 114 (50 µg/mL).

Linhagem	Concentração (µg/mL)	Revertentes	Previsão Linear	Valor de p (ANOVA)	Valor de p (Bernstein)	Slope
TA98 +S9	0	38,33±6,43	37,82	0,146	0,009*	0,592261
	0,005	44,00±23,07	37,83			
	0,05	34,33±13,65	37,85			
	0,5	33,00±4,58	38,12			
	5	48,67±11,24	40,78			
	50	66,33±7,37	67,43			
TA98 -S9	0	18,75±1,5	22,06	0,149	0,01*	0,309254
	0,005	26,00±3,61	22,06			
	0,05	25,33±4,51	22,07			
	0,5	21,33±3,06	22,21			
	5	24,67±3,06	23,60			
	50	37,33±22,28	37,52			
TA100 +S9	0	104,00±23,07	108,32	0,096	0,063	0,364087
	0,005	94,50±6,36	108,33			
	0,05	135,33±12,86	108,34			
	0,5	111,33±5,69	108,50			
	5	101,00±9,90	110,14			
	50	127,33±21,22	126,53			
TA100 -S9	0	74,00±35,36	45,03	0,248	0,293	0,12609
	0,005	43,00±4,24	45,03			
	0,05	35,00±7,07	45,04			
	0,5	57,50±6,36	45,10			
	5	40,50±6,36	45,66			
	50	52,00±15,56	51,34			

Médias do Controle positivo -S9: 4NQO (0,05µg/µL): 204,00 (TA98) e 219,00 (TA100); +S9: 2AA (0,25 µg/µL): 148,00 (TA98) e 946,00 (TA100).

* p<0,05 - indicativo de mutagenicidade.

Tabela 9. Resultado do teste de mutagenicidade realizado com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurim* com o biodegradado (B2) do corante Acid Red 114 (50 µg/mL).

Linhagem	Concentração (µg/mL)	Revertentes	Previsão Linear	Valor de p (ANOVA)	Valor de p (Bernstein)	Slope
TA98 +S9	0	38,33±6,43	32,85	0,292	0,047*	0,282713
	0,005	28,00±1,00	32,85			
	0,05	33,33±4,04	32,86			
	0,5	40,33±12,34	32,99			
	5	30,33±9,45	34,26			
	50	47,67±22,03	46,99			
TA98 -S9	0	25,60±4,77	24,53	0,982	0,477	0,003301
	0,005	23,67±2,31	24,53			
	0,05	24,67±3,06	24,53			
	0,5	23,33±1,15	24,53			
	5	25,00±6,00	24,55			
	50	24,67±6,66	24,70			
TA100 +S9	0	93,00±18,38	104,14	0,232	0,056	0,368867
	0,005	97,00±1,41	104,14			
	0,05	107,00±21,38	104,16			
	0,5	121,00±5,57	104,32			
	5	103,00±11,31	105,98			
	50	122,67±16,26	122,58			
TA100 -S9	0	112,00±3,46	113,33	0,098	0,305	0,045582
	0,005	109,67±6,43	113,33			
	0,05	119,00±0,00	113,33			
	0,5	121,00±12,29	113,35			
	5	103,50±9,19	113,56			
	50	116,33±0,58	115,61			

Médias do Controle positivo –S9: 4NQO (0,05µg/µL): 168,00 (TA98) e 208,00 (TA100); +S9: 2AA (0,25 µg/µL): 148,00 (TA98) e 946,00 (TA100).

* p<0,05 - indicativo de mutagenicidade

Pelos ensaios realizados com o corante, antes da biodegradação, não foi observada nenhuma resposta mutagênica significativa, nem para a linhagem TA 98, nem para a TA 100,

tanto na presença quanto na ausência de S9. Esses resultados indicam que o corante, nas concentrações testadas (12,5 µg/placa; 5,0 µg/placa; 2,5 µg/placa; 0,25 µg/placa; 0,025 µg/placa e 0,0025 µg/placa), não foi mutagênico para as linhagens TA98 e TA100.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Venturini e Tamaro (1979), quando os autores analisaram a atividade mutagênica de 23 corantes de diferentes classes, sendo elas, antraquinonas e azocorantes (monoazo e diazo). Neste trabalho, o corante Acid Red 114 foi testado nas doses de 100, 500 e 1000 µg/placa, nas linhagens TA98, TA100, TA1538 e TA1535, porém nenhuma dose respondeu significativamente ao teste de mutagenicidade. Entretanto, em um estudo realizado por Mortelsman et al. (1986), utilizando as concentrações de 100 a 10000 µg/placa, foi observada uma resposta fracamente positiva para a linhagem TA98 em presença de S9 e uma resposta equívoca (quando não há clareza dos dados) para a linhagem TA100 em presença de S9. Para a linhagem TA1535, que é isogênica da TA100 e promove reversões do mesmo tipo, não foi observada atividade mutagênica significativa. Estes resultados não coincidem com os resultados obtidos neste trabalho, porém as concentrações por placa testadas foram muito superiores às utilizadas no presente estudo e, por isso, podemos inferir que a supressão da atividade mutagênica pode ser decorrente das baixas concentrações do corante usadas nos nossos testes.

Para os biodegradados B1 e B2, também não houve resposta significativa para nenhuma das amostras, em nenhuma das linhagens analisadas, mostrando que o corante após sofrer biodegradação não teve seu potencial mutagênico alterado, permanecendo negativo.

5.7 Isolamento e Identificação dos microrganismos

Foi realizada a identificação da microbiota presente na amostra de lodo da indústria têxtil (amostra inicial) (Tabela 10), para servir de base para as comparações com as bactérias presentes no final do isolamento desta amostra. A resposta obtida foi decorrente da metodologia utilizada, que é exclusiva para identificação de bactérias, pois, caso fossem utilizadas outras metodologias, poderiam ser identificados outros microrganismos, como, por exemplo, fungos filamentosos e leveduras.

Tabela 10. Identificação das bactérias presentes na amostra de lodo de indústria têxtil.

Bactérias
<i>Achromobacter denitrificans</i>
<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Pseudomonas alcaligenes 1</i>
<i>Pseudomonas alcaligenes 2</i>

Identificação por meio de provas bioquímicas manuais, conforme rotina do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP e confirmados pelo sistema automatizado Vitek®2 Compact - BioMérieux®

A partir das diluições em série dos frascos LC (lodo, corante e meio mineral) e L (somente lodo e meio mineral), foram plaqueadas, em PCA, as diluições 10^{-4} e 10^{-6} , previamente incubadas invertidas em estufa a 36°C, por 24 e 48 horas, períodos estes em que foram contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), como segue na Tabela 11.

Tabela 11. Contagem de UFCs presentes nos frascos Erlenmeyer contendo lodo industrial e lodo industrial com adição do corante Acid Red 114, após diluições seriadas em solução salina (0,85%).

Frascos	24 horas		48 horas	
	R1	R2	R1	R2
L (10^{-4})	10^9 *	10^9 *	**	**
L (10^{-6})	80	124	**	**
LC (10^{-4})	10^8 *	10^8 *	**	**
LC (10^{-6})	59	88	**	**

L= lodo industrial + meio mineral; LC = lodo industrial + meio mineral + corante Acid Red 114. R1 e R2 = Réplicas 1 e 2. *Contagem aproximada. **Colônias sobrepostas, impedindo contagem.

Após a adição de 2 mL de corante Acid Red 114 aos frascos LC, a cada 24 horas, por 168 horas (em estufa a 36°C), foram feitos estriamentos de cada amostra (24, 48, 120, 144 e 168 horas), para verificar a sobrevivência das bactérias. Foi selecionado, para a continuidade dos ensaios, o tempo de 168 horas, uma vez que várias colônias ainda estavam presentes, após esse tempo. Estes frascos foram subdivididos em quatro outros, colocando-os em diferentes condições: aeróbicas (shaker a 36°C), com suplementação (0,25% de glicose; 0,25% de extrato de levedura e 0,25% de peptona) e sem suplementação; anaeróbicas (estufa a 36°C), com suplementação (a mesma anteriormente descrita) e sem suplementação, por 240 horas. Ao final deste procedimento, foram feitos estriamentos em placas contendo PCA + corante, na concentração de 50 µg/mL, para seleção de bactérias formadoras de halo de degradação ou com capacidade de adsorção (Tabela 12).

As colônias selecionadas foram novamente estriadas em outras placas (PCA + corante), para uma melhor purificação da amostra e, após 120 horas, foram analisadas visualmente, quanto a sua eficiência em biodegradação e adsorção. Das colônias pré-selecionadas (Tabela 12), foram ainda coletadas amostras de colônias das placas 2B, 2C, 2F e 4I. Estas colônias foram identificadas (Tabela 13) e transferidas para outros frascos com caldo nutriente, onde foram mantidas, em geladeira (4°C), para utilização como inóculo nos ensaio de biodegradação.

Tabela 12. Colônias selecionadas, após procedimentos restritivos (fonte de carbono e metabolismo), e os efeitos observados nas placas contendo PCA e o corante Acid Red 114.

Condição	Suplementação	Identificação	Nº de colônias selecionadas	Efeito observado
Aerobiose	-	1A	1	Adsorção
		2B, 2C e 2D	3	Halo de degradação
Aerobiose	+	2E	1	Adsorção
		2F	Várias (unidas)	Região de degradação
Anaerobiose	-	-	0	Pouca adsorção
		4G e 4H	2	Adsorção
Anaerobiose	+	4I	1	Alta adsorção (coloração mais acentuada)

- meio não suplementado; + meio suplementado (0,25% de glicose; 0,25% de extrato de levedura e 0,25% de peptona)

Tabela 13. Identificação das bactérias isoladas da amostra de lodo de indústria têxtil, após processo de seleção por meio do corante Acid Red 114.

Bactérias	Amostra
<i>Enterococcus faecalis</i>	2B
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2C
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2F
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Achromobacter denitrificans</i>	4I

Identificação por meio de provas bioquímicas manuais, conforme rotina do Laboratório de Microbiologia do HC UNICAMP e confirmados pelo sistema automatizado Vitek®2 Compact - BioMérieux®

Todas as bactérias obtidas após o isolamento microbiológico (*A. faecalis*, *A. denitrificans* e *E. faecalis*), conferiram com as da amostra de lodo inicial (Tabela 10), mostrando que os processos restritivos foram eficazes para a seleção das bactérias.

5.8 Ensaios de biodegradação

Antes da realização do ensaio de biodegradação, foi realizado um pré-ensaio, para verificar a eficácia dos inóculos na redução na coloração da amostra. Estes ensaios foram realizado, por 120 horas, em estufa a 36°C, em frascos Erlenmeyer contendo: meio mineral; inóculo previamente isolado; e corante Acid Red 114 (100 µg/mL). Nesta etapa, foram selecionados os inóculos 2F (*A. faecalis* e *E. faecalis*) e 4I (*A. denitrificans*), que induziram a uma maior redução na coloração e que foram utilizados nos ensaios de biodegradação, gerando os biodegradados B1 e B2, respectivamente.

O inóculo 2F contém 2 bactérias distintas: *A. faecalis* e *E. faecalis*, enquanto que o inóculo 2B contém somente *E. faecalis* e 2C, somente, *A. faecalis*. Apesar do inóculo 2F conter as 2 bactérias identificadas, separadamente, nos inóculos 2B e 2C, a resposta das bactérias, quando isoladas, foi diferente de quando associadas, pois combinadas geraram maior desempenho no potencial de descoloração do corante do que quando isoladas.

A. faecalis, constituinte do biodegradado B1, é uma bactéria gram negativa, catalase e oxidase positiva, com capacidade de reduzir nitrito, mas não de reduzir nitrato a nitrito. Esta bactéria é comumente encontrada em solos, águas e estações de tratamento de águas residuais. Bactérias desta espécie, enriquecidas por processo de desnitrificação de lodo ativado, pode ser responsável por traço significativo de emissões de gases (NO e N₂O) (BERGEY, 2005).

Estudos com *A. faecalis* tem mostrado eficácia na biodegradação de fenóis (BAI, et al., 2007; JIANG et al., 2007).

E. faecalis, também presente no biodegradado B1, está incluída no gênero *Enterococcus*, que são bactérias anaeróbias facultativas, gram positivas e catalase negativas. A temperatura ótima de crescimento desta bactéria é de 35°C e são encontradas no trato intestinal humano (NANNIN; MURRAY, 2006; TEIXEIRA et al., 2007).

A. denitrificans, única constituinte do biodegradado B2, é uma bactéria gram negativa, catalase e oxidase positiva, comumente presente em água e solos e raramente causa infecção em humanos (WEITKAMP et al., 2000).

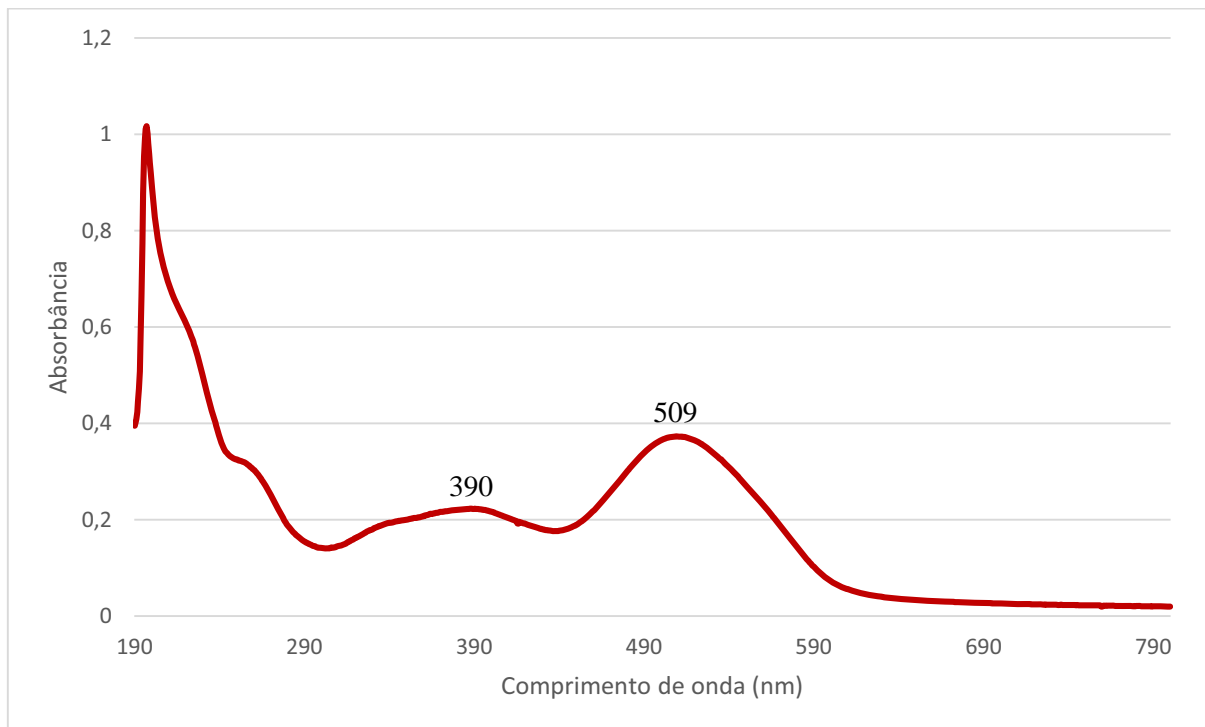
As análises para os ensaios de biodegradação por 144 horas, foram realizadas por meio dos bioensaios com cultura de células humanas (HepG2), com *S. typhimurium* e com leituras de espectrometria UV-Vis e FTIR.

5.9 Espectrofotometria UV-Vis

5.9.1 Espectro de absorção

Os espectros de absorção UV-Vis podem ser utilizados para a detecção dos comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máximo}}$) que uma substância emite, que é correspondente ao grupo cromóforo da molécula. Com esses comprimentos de onda, foi possível determinar a curva característica do corante em estudo, como apresentado na Figura 5.

Figura 5. Espectro de absorção UV-Vis do corante Acid Red 114 diluído em meio mineral (100 µg/mL), pH 6,5 (espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC, caminho óptico de 5 mm), em cubeta de quartzo.



A partir das leituras de espectro, foi observado que o corante Acid Red 114 possui o valor de $\lambda_{\text{máximo}}$ de 509 nm, referente à seu grupo cromóforo e um segundo pico máximo, de 390 nm.

5.9.2 Análise da biodegradação

Os indícios de biodegradação podem ser determinados pela absorbância relativa, que é calculada a partir dos dados obtidos pela espectrofotometria UV-Vis (Figuras 6 e 7). O cálculo foi realizado pela razão entre as absorbâncias, dos dois comprimentos de onda diferentes, A_{509}/A_{390} , do corante Acid Red 114.

Outro parâmetro para análise segundo Won et al. (2008) e El-Rahin et al. (2009), é a porcentagem de descoloração, que pode ser calculado a partir da fórmula:

$$\% \text{ de descoloração} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

Os dados referentes às absorbâncias relativas e à porcentagem de descoloração destes ensaios estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14. Absorbância relativa e porcentagem de descoloração do corante Acid Red 114 (100 µg/mL) diluído em meio mineral e dos biodegradados B1 e B2, após 144 horas de tratamento.

Amostra	Tempo de tratamento (horas)	Absorbância Relativa (509nm/390nm)	Descoloração (%)
Controle	0	1,68	0
B1	144	2,57	51,24
B2	144	2,16	33,52

Segundo Glenn e Gold (1983), se os valores de absorbância relativa de uma amostra permanecerem constantes, em relação aos valores de absorbância relativa da solução controle, é porque esta havendo um processo de biossorção. Porém, se houver variação significativa entre esses valores, já é indício de biodegradação. Portanto, pelos valores observados na Tabela 14, tanto a amostra B1 quanto a amostra B2 sofreram biodegradação e não biossorção. Ainda é possível observar, por esta mesma tabela, que as bactérias da amostra B1 promoveram maior descoloração da curva do que a da amostra B2.

Figura 6. Espectro de absorção UV-Vis do corante Acid Red diluído em meio mineral (100 µg/mL), pH 6,5e do biodegradado B1, após 144 horas de tratamento com *A. faecalis* e *E. faecalis* (espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC, caminho óptico de 5 mm).

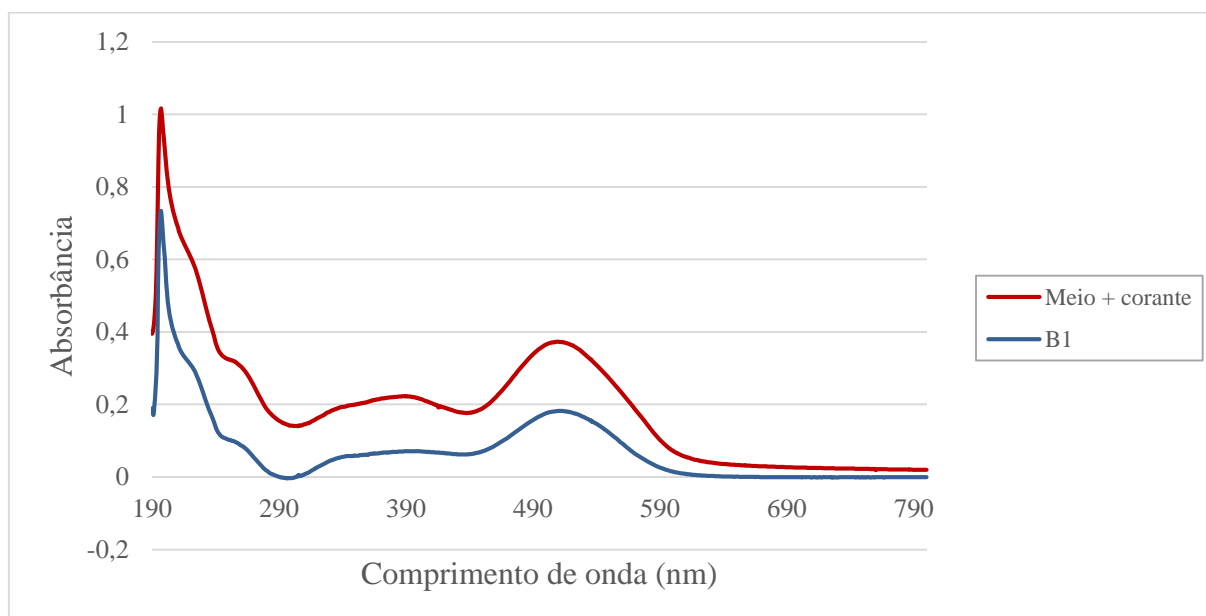
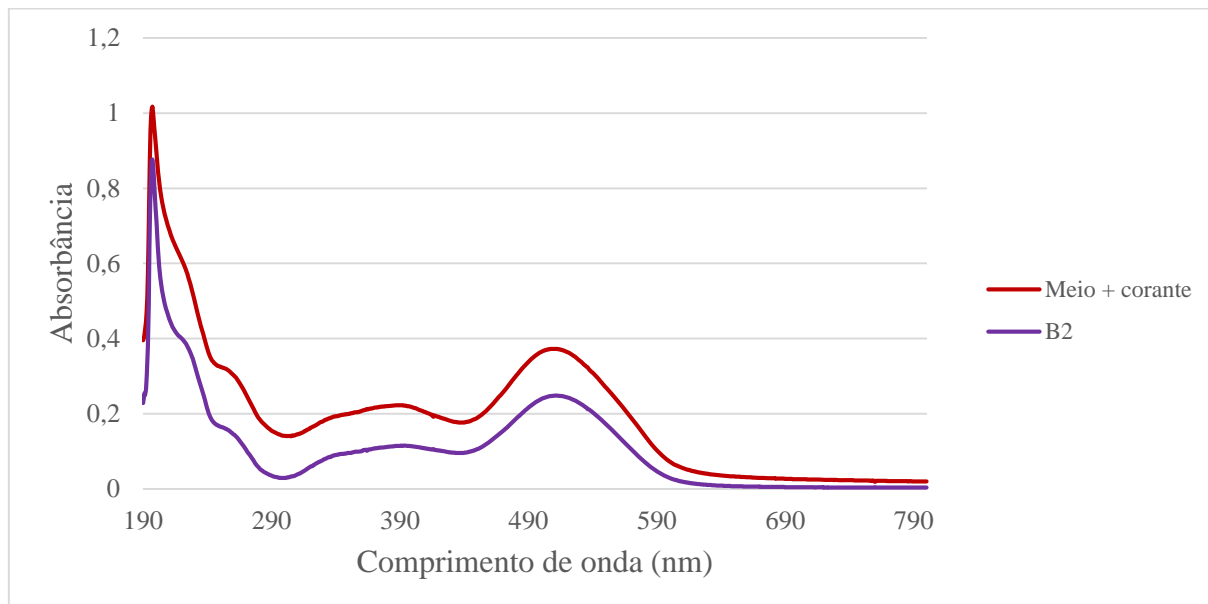


Figura 7. Espectro de absorção UV-Vis do corante Acid Red 114 diluído em meio mineral (100 µg/mL), pH 6,5 e do biodegradado B2, após 144 horas de tratamento com *A. denitrificans* (espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC, caminho óptico de 5 mm).



5.10 Espectrofotometria FTIR

A espectrofotometria de infravermelho é uma técnica bem estabelecida, utilizada para identificar presença ou ausência de grupos funcionais ou, ainda, alterações na estrutura molecular (CONLEY, 1972; SKOOG; LEARY, 1992; WADE, 1995). A energia do infravermelho, situada entre o visível e as micro-ondas, compreende a região de espectro entre 14290 e 200 cm^{-1} . A região entre 4000 a 400 cm^{-1} é a de maior importância para análise dos compostos orgânicos (SILVERSTEIN et al., 1994; BARBOSA, 2007).

O espectro no infravermelho é característico de cada molécula, porém, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem aproximadamente na mesma frequência. São essas bandas características de grupos que permitem a obtenção de informações estruturais das moléculas, por meio de análise de espectro e consulta em tabelas (SILVERSTEIN et al., 1994)

Os espectros obtidos no infravermelho podem ser subdivididos em 3 regiões: região 1, compreendendo aos comprimentos entre 4000 e 1300 cm^{-1} , que é denominada região dos grupos funcionais, como OH, NH e C=O; região 2, entre 1300 e 900 cm^{-1} , que é denominada impressão digital, uma vez que ela determina a identidade do composto, e costuma ser muito complexa; e região 3, entre 900 e 500 cm^{-1} , que geralmente apresenta bandas fortes nos casos de compostos aromáticos, heteroaromáticos e alquenos (BARBOSA, 2007).

As comparações entre a solução controle e as soluções tratadas (B1 e B2), estão apresentadas nas Figuras 8 e 9. As alterações mais significativas para o corante aparecem no espectro de 2000 a 400 cm^{-1} , sendo, então, esta reunião focada para resultados. Analisando esses espectros, foi possível verificar as regiões que sofreram alterações após os tratamentos por 144 horas e, a partir deste dado, realizar uma estimativa dos compostos gerados após os tratamentos.

Figura 8. Espectros de FTIR, região entre 2000 a 400 cm^{-1} , do corante Acid Red 114 diluído em meio (controle) e do biodegradado B1.

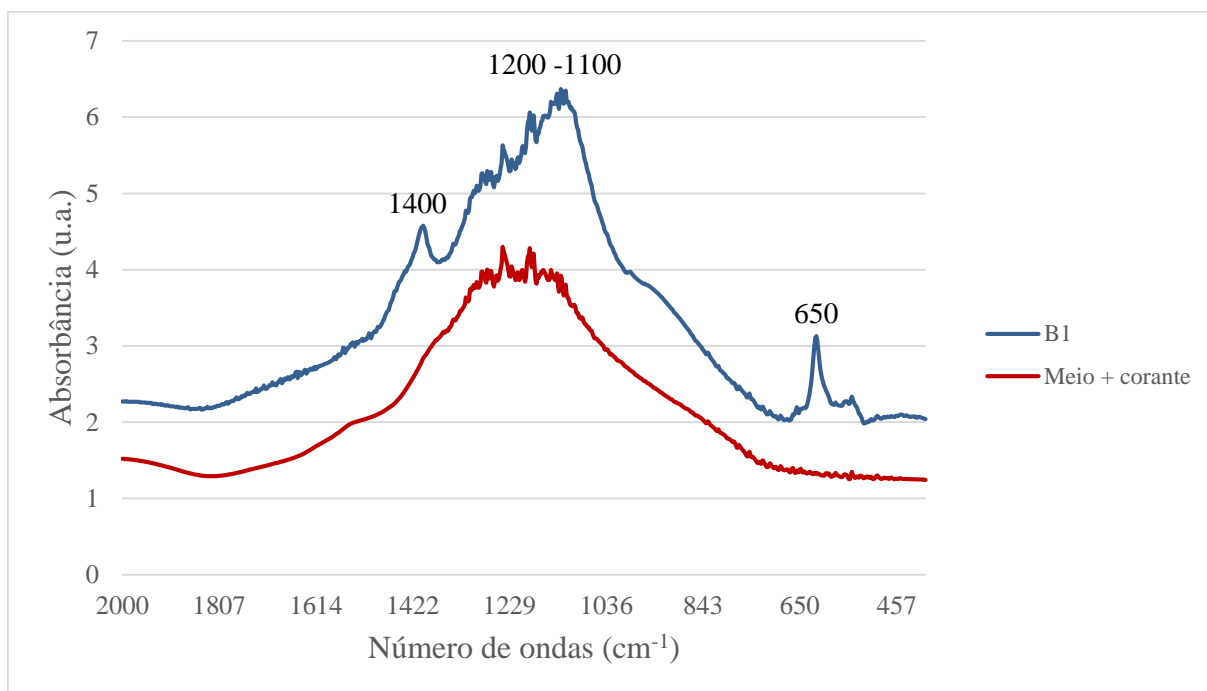
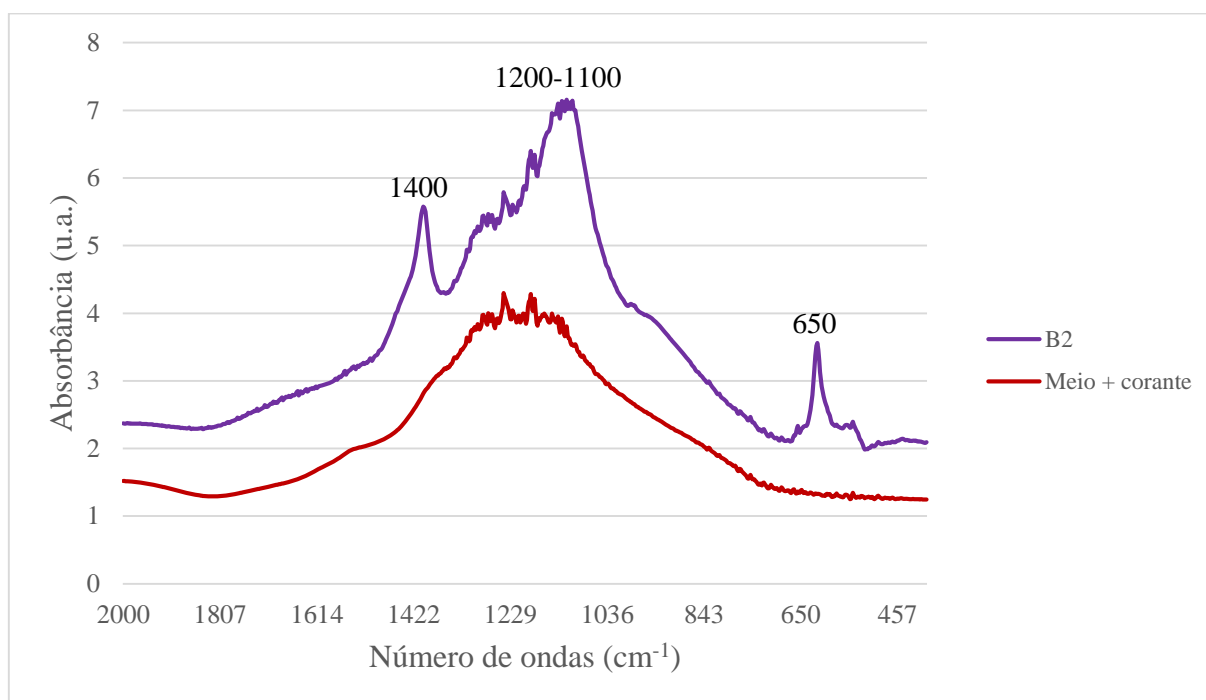


Figura 9. Espectros de FTIR, região entre 2000 a 400 cm^{-1} , do corante Acid Red 114 diluído em meio (controle) e do biodegradado B2.



O espectro da Figura 8, representa o biodegradado B1, enquanto que o espectro da Figura 9 representa o biodegradado B2, que, apesar de terem sido tratados com bactérias diferentes, obtiveram um espectro muito similar. Os mesmos resultados de bandas foram vistos nas duas amostras, sendo possível notar a diferença no espectro dos biodegradados, tanto para B1 quanto para B2, em relação ao controle, o que indica a ocorrência de biodegradação nas duas amostras. Este resultado também mostra que os compostos formados, após o processo de biodegradação, foram os mesmos.

Uma variação nos espectros ocorre na região de 1400 cm^{-1} , onde a banda aparece intensificada nos biodegradados B1 e B2. Essa região é característica do estiramento de N=N (CERVANTES et al., 2009; FRANCISCON et al., 2009) e pela presença de aminas (WHARFE et al., 2010). Com isso, pode-se inferir que as enzimas das bactérias interferiram nas ligações da molécula do corante, provavelmente rompendo as ligações azo e formando um novo metabólito, com liberação de aminas para a solução. A formação de aminas aromáticas é um problema grave dos azocorantes, pois, muitas vezes, o composto torna-se ainda mais tóxico após a clivagem, sendo que, muitas delas são reconhecidas pela sua ação mutagênica e carcinogênica (GUARATINI; ZANONI, 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

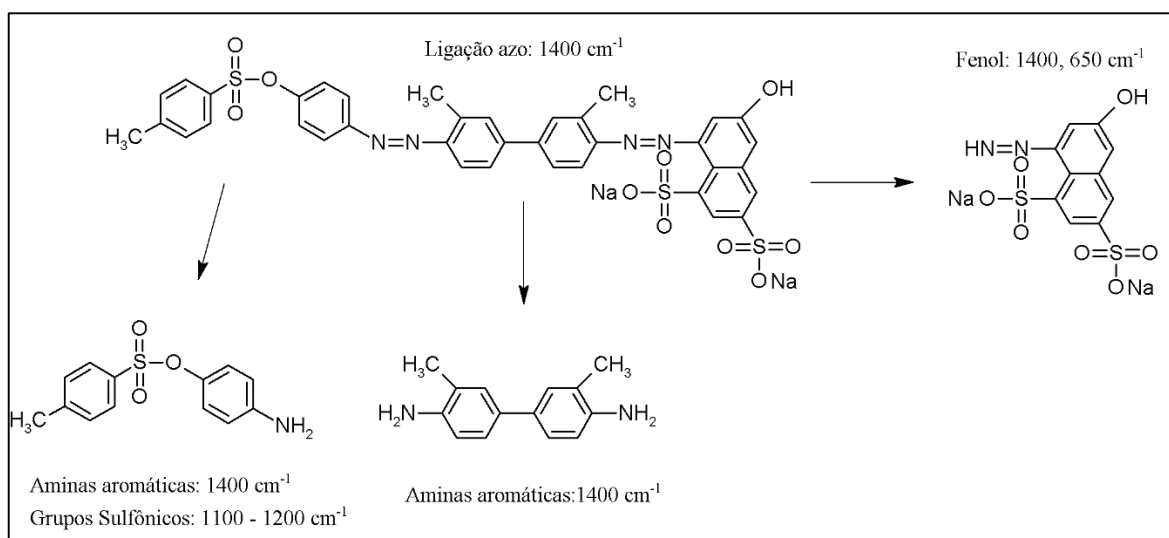
O aparecimento de banda na região de 650 cm^{-1} indica a presença de grupos fenólicos, assim como o aumento da intensidade na região de 1400 cm^{-1} também pode ser decorrente da

presença deste grupo na amostra (ABBAS et al., 2008; POLJANSEK; KRAJNC, 2005; SILVERSTEIN et al., 1979). O aparecimento deste grupo também pode ser devido à ruptura das ligações do corante, que evidencia a ocorrência do processo de biodegradação. A formação de compostos fenólicos pode elevar o efeito tóxico do corante, pelo fato dos fenóis serem tóxicos para animais e plantas, por conseguirem penetrar, com facilidade, na pele e nas membranas celulares, o que os tornam genotóxicos, mutagênicos, hepatotóxicos e interferentes na velocidade de reações biocatalisadas de respiração e fotossíntese (ORTEGA et al, 1994; RUSSEL; BURTON, 1999).

Outras bandas que surgiram foram em torno de 1100 a 1200 cm^{-1} . Essa região indica a presença de grupos sulfônicos, devido ao estiramento das ligações S=O (BARBOSA, 2007). Esses grupos sulfônicos contribuem para a resistência dos corantes aos processos de degradação, seja ela química ou microbiológica (DELLAMATRICE, 2005; MARTINS et al., 2001; STOLZ, 2001, HU e WU 2001).

Assim, de acordo com os resultados obtidos nesta análise e também concordante aos resultados obtidos pela absorbância relativa do espectro UV-Vis, foi possível confirmar a biodegradação do corante Acid Red 114 pelas bactérias *A. faecalis*, *E. faecalis* e *A. denitrificans*. Na Figura 10 foi esquematizado o provável caminho de biodegradação do corante Acid Red 114 e os possíveis subprodutos gerados.

Figura 10. Caminho proposto para a biodegradação inicial do corante Acid Red 114, após 144 horas de tratamento com as bactérias *A. faecalis* e *E. faecalis* (B1) e *A. denitrificans* (B2).



6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste estudo, antes e após o processo de biodegradação do corante Acid Red 114, por meio de ensaios biológicos de genotoxicidade e mutagenicidade realizados com *Salmonella typhimurium* e cultura de células humanas (HepG2), bem como ensaios físico-químicos, por meio de espectrofotometria UV-Vis e FTIR, permitem inferir que:

✓ O teste do MTT, mesmo após sucessivas lavagens, se mostrou um teste ineficaz para avaliação da viabilidade celular com o corante Acid Red 114, visto que o corante remanescente nas amostras promoveram interferência nas leituras de absorbância do espectrofotômetro;

✓ O teste de viabilidade com Azul de Tripán se mostrou eficaz para a avaliação da viabilidade celular deste corante, pois não ocasionou problema de interferência colorimétrica, e se mostrou, ainda, sensível para detectar as concentrações tóxicas para a linhagem HepG2. Neste ensaio, o tempo de exposição de 24 horas teve maior diminuição da viabilidade celular que o tempo de 3 horas e as concentrações do corante acima de 125 µg/mL levaram a índices de viabilidade inferior a 80%, mostrando serem citotóxicas para as células HepG2;

✓ O ensaio do cometa com células HepG2 se mostrou uma boa ferramenta para a avaliação de genotoxicidade do corante, tanto antes como após a biodegradação, evidenciando a sensibilidade deste teste. Pelos ensaios de genotoxicidade, foi possível observar que a biodegradação não foi eficiente para diminuir o potencial tóxico do corante;

✓ O teste do MN com células HepG2 se mostrou sensível para detecção do potencial mutagênico das amostras avaliadas, indicando ser uma boa ferramenta de estudo;

✓ O teste de *Salmonella*/microsoma não mostrou alta sensibilidade para as baixas doses testadas, que corresponderam às concentrações utilizadas nos outros ensaios;

✓ O corante Acid Red 114 foi potencialmente mutagênico, quando avaliado pelo teste do MN em células HepG2, porém o mesmo resultado não foi encontrado no teste de *Salmonella*/microsoma. Desta forma, é necessário cautela no uso deste corante, porque as concentrações/placa testadas no teste de *Salmonella*/microsoma foram menores que nos outros ensaios e a cultura de células humanas tem maior correspondência ao sistema humano que organismos procariontes;

✓ O biodegradado B1, produzido pelo tratamento com as bactérias *Alcaligenes faecalis* e *Enterococcus faecalis*, se mostrou potencialmente mutagênico pelo teste do MN em células HepG2 e negativo para mutagenicidade no teste *Salmonella*/microsoma, mantendo os mesmos resultados obtidos para o corante antes da biodegradação. Assim, pode-se concluir que mesmo que o biodegradado tenha sido mais eficiente para a retirada da cor do corante, não foi eficiente para reduzir o potencial mutagênico;

✓ O biodegradado B2, produzido pelo tratamento com a bactéria *Achromobacter denitrificans*, não se mostrou mutagênico no teste do MN em células HepG2, nem no teste de *Salmonella*/microssoma. Apesar da porcentagem de descoloração do B2 ter sido menor que B1 e os compostos gerados terem sido os mesmos nas duas amostras, o B2 mostrou ser menos mutagênico. Isso pode ter ocorrido devido à diferença na quantidade formada dos subprodutos pela biodegradação;

✓ O isolamento dos microrganismos foi uma técnica eficiente para uma melhor apresentação dos resultados, dando maior direcionamento à ação promovida pela biodegradação;

✓ O uso do lodo derivado de indústria têxtil para o isolamento de microrganismos capazes de promover a biodegradação de corantes têxteis se mostrou promissor, pois estes microrganismos já estão previamente adaptados a estas substâncias e a sua capacidade de degradação pode ser ampliada com o desenvolvimento de técnicas auxiliares;

✓ As leituras de espectrofotometria no UV-Vis e no FTIR, foram ferramentas indispensáveis para detecção da atividade de biodegradação, bem como para a identificação dos possíveis compostos gerados após o processo;

✓ De forma geral, o corante Acid Red 114, utilizado na indústria têxtil teve resultados positivos para mutagenicidade e genotoxicidade e, portanto, seu uso requer cuidados, tanto aos trabalhadores expostos durante a produção na indústria, quanto para o ambiente, onde seus resíduos são descartados;

✓ A biodegradação promovida neste trabalho teve maior eficiência na descoloração do corante do que na diminuição de sua toxicidade. O potencial genotóxico não diminuiu em nenhum dos biodegradados e o potencial mutagênico teve maior diminuição no biodegradado B2. Portanto, para maior eficiência deste processo, são necessários outros tratamentos que atuem na diminuição da toxicidade destes compostos gerados nesta biodegradação inicial.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, O.; REBUFA, C.; DUPUY, N.; KISTER, J. FTIR - Multivariate curve resolution monitoring of photo-Fenton degradation of phenolic aqueous solutions - Comparison with HPLC as a reference method. **Talanta: an international journal of analytical chemistry**, London, v.77, n.1, p.200-209, 2008.
- ACUNER, E; DILEK, F.B. Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 623-631, 2004.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, Amsterdam, v.560, p.57-67, 2004.
- ANGELIS, D.F.; COVOLAN, H.; OLIVEIRA, J.; CORSO, C.R.; KIYAN, C. Remoção de compostos azo por *Saccharomyces boulardii* IZ-1904. **Ciência e cultura**, v. 34, p. 585, 1982.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM), Brasília. **Aplicações**. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_aplicacoes.asp> Acesso em: novembro de 2011.
- AUBERT, S; SCHWITZGUEBEL, J. P. Screening of plant species for the phytotreatment of wastewater containing sulphonated anthraquinones. **Water Research**, v. 38, p. 3569-3575, 2004.
- BAI, J.; WEN, J-P.; LI, H-M.; JIANG, Y. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. **Process Biochemistry**, v.42, p.510-517, 2007.
- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresources Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**, Editora UFV, 2007, 189 p.
- BERNSTEIN, M.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**, v.97, p.267-281, 1982.
- BOLOGNESIM, C.; PERRONE, E.; ROGSCIUTTO, A.; GIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 93-98, 2006.

- BRASIL. Resolução CONAMA nº 357/2005. 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de março de 2005.
- BROWN, D.; LABOUREUR, P. The aerobic biodegradability of primary aromatic amines. **Chemosphere**, v. 12, p. 405-414, 1983.
- CARVALHO, T. U. Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). Métodos de Estudo da Célula. Rio de Janeiro: **FENORTE/UENF.**, v.2, p.45-58, 1996.
- CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v.74, p.264-271, 2005.
- CERVANTES, T. N. M.; ZAIA, D. A. M.; SANTANA, H. Estudo da fotocatalise heterogênea sobre Ti/TiO₂ na descoloração de corantes sintéticos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2423-2428, 2009.
- CHUNG, K. T.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 3, p. 201–220, 1992.
- CONLEY, R.T. **Infrared Spectroscopy**. Allyn and Bacon: Boston, 1972.
- CONNOR, J.A.; FERGUNSON, M.A. **Essential medical genetics**. Smith Blackwell Scientific Publications. London, 260pp. 1993.
- DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana-sp**. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, SP, 2005.
- EL-RAHIN, W.M.A.; EL-ARDY, O.A.M.; MOHAMMAD, F.H.A. The effect of pH on bioremediation potential for the removal of direct violet textile dye by *Aspergillus niger*. **Desalination**, v.249, p.1206-1211, 2009.
- ERGENE, S.; CAVAŞ, T.; CELIK, A.; KÖLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A.; Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v.16, p.385-391, 2007.
- FENECH, M. The advantage and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v.392, p.11-18, 1997.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v.504, p.131-136, 2002.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.

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

FERRAZ, E.R.A.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F.M.D.; ZANONI, M.V.B.; DORTA, D.J.; OLIVEIRA, D.P. Differential Toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames Test, HepG2 Citotoxicity Assay, and Daphnia Acute Toxicity Test. **Environmental Toxicology**, 2010.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

FRANCISCON, E.; ZILLE, A.; DIAS GUIMARO, F.; MENEZES, C. R.; DURRANT, L.R.; CAVACO-PAULO, A. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 280-288, 2009.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., p.360-361, 2005.

GARRITY, G.B. (Ed). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2ed., v.2, New York: Springer, 2005.

GIORDANO, G. **Tratamento e controle de efluentes industriais**, 2004. Disponível em: <<http://xa.yimg.com/kq/groups/24138517/1421219182/name/Apostila+-+Tratamento+de+efluentes+industriais.pdf>> Acesso em: dezembro de 2013.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1741-1747, 1983.

GONDIM, A. L. N.; BARBOSA, A. P. A.; PAZ, M. C. F. **Remoção biológica de corantes têxteis através do consórcio bacteriano entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986**. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, n. 2, 2007, João Pessoa, PB.

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

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

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v.399, p.125-133, 1998.

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

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

HU, A. T. L.; WU, S. C. Assessment of the azo dye RP2B on the growth of a nitrogen Fixing cyanobacterium: *Anabaena* sp. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 93-95, 2001.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, p. 520–522, 1994.

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

JIANG, Y.; WEN, J.; BAI, J.; JIA, X.; HUA, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Hazardous Materials**, v.147, p.672-676, 2007.

JINKI, L; HOUTIAN, L. Degradation of azo dyes by algae. **Environmental Pollutants**, v.75, p. 273-278, 1992.

KIM, S.J.; SHODA, M. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 62, p. 14-119, 1999.

KIRSCH-VOLDERS, M.; CUNDARI, F.; VERDOODT, B. Towards a unifying model for the metaphase/anaphase transition. **Mutagenesis**, v.13, p.321-335, 1998.

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

KLOBUCAR, G.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for

genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p.15-23, 2003.

KNOWLES, B.B.; HOWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v.209, p.497-499, 1980.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNY, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communication**, v.3, p.103-115, 1995.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUCK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test realibly measures genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v.415, p.47-57, 1998.

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

LINDBERG, H.K.; WANG, X.; J'ARVENTAUS, H.; FALCK, G.C.M.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research**, v.617, p.33-45, 2007.

MARON, D.M., AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-214, 1983.

MARTINS, M. A. M.; FERREIRA, I. C.; SANTOS, I. M.; QUEIROZ, M. J.; LIMA, N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**. v. 89, n. 2-3, p. 91-98, 2001.

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

MBULIGWE, S.E. Comparative treatment of dye-rich wastewater in engineered wetland systems (EWSs) vegetated with different plants. **Water Research**, v. 39, p. 271-280, 2005.

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

MISHELL, B. B.; SHIIGI, S. M. **In Selected Methods in Cellular Immunology**. San Francisco: Freeman and Company, p. 16-19, 1980.

- MORTELMANS, K.; HAWORTH, S.; LAWLOR, T.; SPECK, W.; TAINER, B.; ZEIGER, E. *Salmonella* mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. **Environmental Mutagenesis**, v.8, p.1-119, 1986.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29–60, 2000.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MOTSCHI, H. Assessment and management of environmental exposure to colorants. **Chemical Safety**, M. Richardson Ed., p. 329-352, 1994.
- NANNIN, E.C.; MURRAY, B.E. *Enterococcus* spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), **Principles and Practice of Clinical Bacteriology** (2ed., pp. 59-71). West Sussex UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2006.
- OBE, G.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. Role of DNA double strand breaks in the formation of radiation induced chromosomal aberrations. **Progress in Mutation Research**, v. 4, p.1-9, 1982.
- OLIVEIRA, D.P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais – um estudo de caso**. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent - Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v.626, p.135-142, 2007.
- ORTEGA, F.; DOMINGUEZ, E.; BURESTEDT, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, v.675, p. 65-78, 1994.
- ÖZTÜRK, A.; ABDULLAH, M.I. Toxicological effect of indole and its azo dye derivatives on some microorganisms under aerobic conditions. **Science of the Total Environment**, v.358, p. 137-142, 2006.
- PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v.490, p.209-214, 2001.
- POLJANSEK, I.; KRAJNC, M. Characterization of Phenol-Formaldehyde Prepolymer Resins by In Line FT-IR Spectroscopy. **Acta Chimica Slovenica**, v. 52, n. 3, p. 238-244, 2005.

- RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**, Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, p. 59-75, 1991.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Brasil: ULBRA, 2003. 355p.
- ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.
- ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- RUSSEL, I.M.; BURTON, S.G. Development and demonstration of na immobilised-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water. **Analytical Chimica Acta**, v.389, p.161-170, 1999.
- SÃO PAULO. Projeto de Lei nº 333/2012. Proíbe o lançamento direto nos rios, lagos, represas e demais corpos de água doce do Estado de efluentes que, resultantes de processo industrial, contenham corantes em sua composição. **Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo**, São Paulo, 22 de maio de 2012.
- SCHMIDT, W.; The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, p. 31-53, 1976.
- SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 38–45, 2001.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. **Principles of Instrumental Analysis**. Saunders College: Philadelphia, 1992.
- SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; Hartmann, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v.681, p.3-12, 2009.
- STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 69-80, 2001.
- TATES, A.D.; NEUTEBOOM, I.; HOFKER, M.; DEN ENGELSE, L. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN/DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*. **Mutation Research**, v.74, p.11, 1980.

- TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; FACKLAM, R.R.. *Enterococcus*. In P. R. Murray (Ed.), **Manual of Clinical Microbiology** (9th ed., pp. 430-442). Washington D.C.: ASM., 2007.
- TEXBRASIL – Programa de Internacionalização da Indústria da Moda Brasileira. **Dados gerais da indústria da moda brasileira referentes ao ano de 2012**. Disponível em: <<http://www.texbrasil.com.br/texbrasil/SobreSetor.aspx?tipo=15&pag=1&nav=0&tela=SobreSetor>> Acesso em: janeiro de 2014
- TRINDADE, R.C.; ANGELIS, D.F.; CAMARGO, A.T. Estudos sobre adsorção de compostos azóicos por leveduras do gênero *Rhodotorula*. In: **Simpósio Nacional de Fermentação, Programas e Resumos de Comunicações**. UEL, Londrina, Paraná, p. 10, 1986.
- UDROIU, I. Review: The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201-204, 2006.
- UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215-224, 1999.
- UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p.81-112, 2003.
- VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J.C.; BONA, A.M.L.; CHAGNONA, M.C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p.79-90, 2003.
- VENTURINI, S. ; TAMARO, M. Mutagenicity of anthraquinone and azo dyes in Ames' *Salmonella typhimurium* test. **Mutation Research**, v.68, p.307-312, 1979.
- WADE, L.G. **Organic chemistry**. Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 1995.
- WEBER, E.J.; ADAMS, R.L. Chemical – and sediment – mediated reduction of the azo dye disperse blue 79. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 1163-1170, 1995.
- WEITKAMP, J.; TANG, Y.; HAAS, D.; NARINDER, K. Recurrent *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia associated with persistent lymph node infection in a patient with hyper-immunoglobulin M syndrome. **Clinical Infection Diseases**, v.31, p.1183-1187, 2000.
- WHARFE, E. S.; JARVIS, R. M.; WINDER, C. L.; WHITELEY, A. S.; GOODACRE, R. Fourier transform infrared spectroscopy as a metabolite fingerprinting tool for

monitoring the phenotypic changes in complex bacterial communities capable of degrading phenol. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 3253-3263, 2010.

WON, S.W.; CHOI, S.B.; CHUNG, B.W.; PARK, D.; PARK, J.M.; YUN, Y.S. Biosorptive decolorization of Reactive Orange 16 using the waste biomass of *Corynebacterium glutamicum*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.43, p.7865-7869, 2004.

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