

Jefferson Honorio Franco

Biotransformação de corantes dispersos do tipo azo pela ação de enzimas redutoras e oxidação fotoeletrocatalítica após pré-concentração por MIP

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin Zanoni
Co-Orientador: Dr.^a Bianca Ferreira da Silva

**Araraquara
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

F825b Franco, Jefferson Honório
Biotransformação de corantes dispersos do tipo azo pela ação de enzimas redutoras e oxidação fotoeletrocatalítica após pré-concentração por MIP / Jefferson Honório Franco. – Araraquara : [s.n.], 2016
148 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Valnice Boldrin
Coorientador: Bianca Ferreira da Silva

1. Corantes e tingimento. 2. Toxicologia ambiental.
3. *Escherichia coli*. 4. Biotransformação (Metabolismo).
5. Espectrometria de massa. I. Título.

JEFFERSON HONORIO FRANCO

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Araraquara, 21 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Cintia Duarte de Freitas Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Pires Serrano
Instituto de Química, USP – São Paulo - SP



Prof^a. Dr^a. Patricia Alves Carneiro
Instituto de Ciências Exatas, UFF – Rio de Janeiro - RJ

Dados Curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Jefferson Honório Franco

Nome em citações bibliográficas: FRANCO, JEFFERSON

ENDEREÇO PROFISSIONAL

1) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Laboratório de Eletroanalítica
Rua Prof. Francisco Degni, 55. Jd. Quitandinha, CEP: 14800-900 – Araraquara – SP
Telefone: 16 3301-9519

E-mail: jeffersonhfranco@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação

Bacharelado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Campus Araraquara

Local: Araraquara – SP

Curso: Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas

Período: 2006-2009

Trabalho Orientado em Química – Departamento de Química Físico-Química:

- “Eletroquímica de ligas de cobre: Sistemas polifásicos e monofásicos policristalinos e monofásicos monocristalinos”- Bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti

- Estágio supervisionado de 240 horas no Cempecq- Centro de Monitoramento e Pesquisa da qualidade de combustíveis, petróleo e derivados

Pós Graduação

Mestrado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Campus Araraquara

Local: Araraquara – SP

Período: 2010-2012

Bolsista: CAPES

Título da Dissertação: Determinação de corantes de cabelo e derivados em água e tintura comercial por cromatografia líquida de alta eficiência

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin Zanoni

Doutorado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Campus Araraquara

Local: Araraquara – SP

Período: 2012-2016

Bolsista: CAPES

Título da Tese: Biotransformação de corantes dispersos do tipo azo pela ação de enzimas redutoras e oxidação fotoeletrocatalítica após pré-concentração por MIP.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin Zanoni

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Bianca Ferreira da Silva

Estágio em Instituição de Ensino no Exterior:

1) Instituição: Universitat Autònoma de Barcelona – BA

Local: Cerdanyola del Vallés, Espanha

Período: Maio/2015 – Outubro/2015

Bolsista: CNPq

Projeto: “Detecção de corantes têxteis baseados em MIPs magnéticos associados ao Teste de Elisa”

Orientadora no Exterior: Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori

Orientadora no Brasil: Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin Zanoni

Coordenadora Geral do Projeto: Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. FRAGA, L. E.; FRANCO, J. H.; ORLANDI, M. O.; ZANONI, M. V. B. Photoelectrocatalytic oxidation of hair dye basic red 51 at W/WO₃/TiO₂ bicomposite photoanode activated by ultraviolet and visible radiation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, p. 194-199, 2013.
2. FRANCO, J. H.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Using ionic liquid combined with HPLC-DAD to analyze semi-permanent hair dyes in commercial formulations. **Anal. Methods**, v. 7, p. 1115-1122, 2015.
3. OLIVEIRA, R.; HUDARI, F.; FRANCO, J.; ZANONI, M. V. B. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Sensor for the Determination of Anthraquinone Hair Dyes in Wastewaters. **Chemosensors**, v. 3, p. 22-35, 2015.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- FRANCO, J. H.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. “Biotransformation of textile dyes with LC-MS/MS and electrochemical sensors”, **XX TRANSFRONTIER MEETING OF SENSORS AND BIOSENSORS (TMSB)**, 2015, Perpignan, França.
- FRANCO, J. H.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. “Effect of chlorination of Basic Yellow 57 hair as contaminant in wastewater samples by LC-MS/MS”, **5º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas (BRMASS)**, 2013, Campinas, SP, Brasil.
- FRANCO, J. H.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Determinação de corantes de cabelo em águas de lavagem por LC-MS-MS. **17º ENQA Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, 2013, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- FRANCO, J. H.; LIZIER, T.M.; ZANONI, M. V. B. “Avaliação de corantes em tinturas de cabelo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos”, **16º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, 2011, Campos do Jordão, SP, Brasil.

ORIENTAÇÕES

Co-orientador de Elisa Maria Christovam: Projeto intitulado: Desenvolvimento e validação de método em LC-MS/MS para determinação do corante Acid Black 210 em efluentes de curtume e avaliação da genotoxicidade. Início: 2014.

OUTRAS EXPERIÊNCIAS ACADÊMICAS

- Estágio docência:

Análise Instrumental: Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Araraquara, Brasil.
Supervisora: Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar TaboadaSotomayor.

*“aos meus pais Edson e Nilva, meus irmãos Michel e Lucas
e à minha avó Nair por todo carinho, amor, paciência
e apoio em minhas escolhas e decisões”.*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, minha avó e meus dois irmãos por serem as pessoas mais importantes da minha vida e sempre me apoiarem, além de compartilharem minhas alegrias, minhas angústias e estarem presentes por todo esse caminho árduo que trilhei.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Valnice Boldrin por todo o ensinamento profissional e pessoal, pela paciência, incentivo, confiança, conselhos, além de sua brilhante orientação nesses seis anos em que estivemos juntos, formando o profissional que sou hoje.

À minha coorientadora Dr.^a Bianca Ferreira da Silva pela realização das análises de espectrometria de massas e pela ajuda, atenção e amizade.

Aos Professores Nelson R. Stradiotto e Hideko Yamanaka pelas discussões, auxílio e ensinamento.

Um agradecimento em especial à Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor com quem tive a oportunidade de aprender muito na nossa parceria no estágio docência realizado em 2014, além da oportunidade de bolsa e confiança pela realização do doutorado sanduíche.

Agradeço a todas as parcerias profissionais que fiz durante o doutorado, em especial à Prof.^a Dr.^a Regina Vicenzi Oliveira (UFSCAR), Prof.^a Dr.^a Danielle Palma de Oliveira (USP-Ribeirão Preto), Dr.^a Elisângela Franciscón Dias (UNICAMP- Limeira) e a doutoranda Gabriela Meireles (USP - Ribeirão Preto).

À Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori pela oportunidade, atenção e profissionalismo prestado durante o doutorado sanduíche realizado na Universidade Autônoma de Barcelona, na Espanha. E aos integrantes do grupo pela imensa ajuda, amizade, e diversão, em especial: Raquel, Laura, Alejandra, Anna e Delfina. Queria agradecer em especial à Olga, que me ajudou muito quando fui pra Barcelona e se tornou uma grande amiga e à Teresa, que foi com quem morei nos 6 meses de doutorado sanduíche e pude aprender muita coisa, além de uma ótima pessoa e amiga. Agradecer às amizades que conquistei em Barcelona, em especial à Eliane e Marianne, que compartilharam comigo os melhores momentos da minha vida e principalmente a Sophia que se tornou uma grande amiga e me proporcionou os melhores momentos, aprendizados e viagens nestes 6 meses fora do país.

À aluna de IC que coorientei durante o doutorado: Elisa Christovam, que me fez evoluir como profissional e me fez ensinar e aprender muito.

Aos meus amigos do laboratório NDcom: Milena, Zezinho, Maísa, Gra e João pelas risadas, barzinhos, conversas informais e ajuda.

Aos meus amigos da Eletroanalítica: Jú, Mariele, Nat, Thais e Tati pela ajuda no laboratório, conversas informais, desabafos e todas as confraternizações.

Aos integrantes e colegas do GEAr pela amizade, colaboração, discussões, em especial: Felipe, Juliano, Guilherme, Rafa e Thaís.

Aos meus grandes amigos que conheço desde minha graduação: Miguel, Marsh, Muringa, Meira, Glauco, Bruna, Pira, Harry, Sofia Veríssimo, Mari “Sorvete”, Fabi, Caramujo, Jú Gomes “Bob”, Nemo, Michele, Sauna, Sociais e Aninha, agradeço pelas risadas, conversas, brincadeiras, distrações, companheirismos, lágrimas, baladas e ajuda nos momentos difíceis. Aos que embora não citados nominalmente, sempre estiveram por perto

demonstrando seu carinho e compreensão. Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de Lençóis Paulista, os quais conheço desde criança e sempre estiveram comigo em todos os momentos da minha vida: Isa “Fanho”, Mari Cecília, Bruna “Testa”, Lorena “Vitrola”, Jú Dalben, Laíz “Menina V”, Dé “Esquilo”, Matheus “Cabeção”, João, Marcus “Gigante” e Bruno.

Às funcionárias da Seção Técnica de Pós-Graduação e da Biblioteca por sempre estarem à disposição para ajudar, informar e tirar dúvidas.

À todos os funcionários e técnicos do Instituto de Química, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNESP pela infraestrutura e acolhida durante esses anos.

À CAPES peça bolsa concebida no país.

À CNPq pelo financiamento do estágio no exterior na Espanha.

*It must be a strange world not being a scientist, going through life not knowing
– or may be not caring about where the air came from, where the stars at night came
from or how far they are from us. I Want To Know”.*

- Michio Kaku

RESUMO

Corantes sintéticos do tipo azo têm sido um assunto de grande preocupação ambiental devido ao potencial genotóxico e mutagênico dos produtos de biotransformação. Deste modo, nos últimos anos a consequência da ingestão destes corantes presentes na água potável servida à população é discutida por diversos autores. Este estudo avalia a ação de microssomas de fígado de rato, enzimas redutoras produzidas pela bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) e nitroredutase imobilizada na biotransformação de três corantes dispersos que possuem grupos azo, Disperse Red 73 (DR 73), Disperse Red 78 (DR 78) e Disperse Red 167 (DR 167). A técnica de Espectrofotometria de absorção molecular na região do Uv- visível, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram técnicas usadas para identificar os principais produtos gerados após os processos de degradação dos corantes. Polímeros de impressão molecular magnéticos (MMIPs) foram investigados usando reações de polimerização por precipitação para pré-concentração do corante DR 73, juntamente com a degradação por fotoeletrocatalise e subsequente análise dos produtos por LC-MS/MS. Os estudos *in vitro* do metabolismo de biotransformação dos corantes têxteis com microssoma de fígado de rato mostraram que as reações ocorreram preferencialmente no grupo azo e nitro dos corantes, indicando a redução destes grupos pelas enzimas do citocromo P-450. Foram obtidos dois produtos de degradação para cada corante após reação com a bactéria *E. coli*; o corante DR 73 originou os produtos 3-((4-aminofenil)(etil)amino)propanitrila e 4-nitroanilina, os produtos 3-((4-aminofenil)(etil)amino)propanitrila e 2-cloro-4-nitroanilina foram obtidos após reação com o corante DR78 e o DR 167 originou dimetil 3,3'-((3-acetamido-4-aminofenil)azanediyl)dipropanoato e 2-cloro-4-nitroanilina, indicando a clivagem do grupo azo, possivelmente, pela enzima azoredutase, produzida pela bactéria. A enzima nitroredutase, imobilizada em partículas magnéticas modificadas com tosil, mostrou que a redução dos corantes ocorreu preferencialmente no grupo nitro, enquanto que a enzima livre no meio reacional resultou em mais de um produto de biotransformação para cada corante, atuando em mais de um sítio da molécula, comprovando a eficácia da imobilização enzimática para estudos de biotransformação e formação de produtos majoritários. A mutagenicidade dos corantes foi avaliada pelo ensaio de *Salmonella*/microssoma realizado nas estirpes TA 98 e TA 100, com e sem S9. De acordo com este ensaio, DR 73 foi o mais mutagênico. O MMIP para o corante DR 73 apresentou excelentes valores de religação (16 mg g^{-1} e 6 mg g^{-1} , para MMIP e MNIP, respectivamente) indicando que o polímero molecularmente impresso formou cavidades específicas para retenção do corante. Através dos resultados obtidos por LC-MS/MS, observou-se 100% de degradação do corante em apenas 60 min de tratamento via fotoeletrocatalise para soluções mais diluídas do mesmo, comprovando a eficiência da técnica na degradação de poluentes. Sendo assim, estes resultados sugerem que o MMIP mostrou uma excelente especificidade e seletividade para o corante DR 73 e uma técnica promissora na captação de corantes mutagênicos de águas superficiais, com grande potencial de aplicação e exploração na pré-concentração antes do tratamento. Além disso, a redução destes corantes por sistemas biológicos representa uma grande preocupação ambiental devido ao aumento da genotoxicidade para os seres vivos, em especial a seres humanos, produzindo compostos nocivos, tais como aminas condenadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer.

Palavras-chave: Corantes dispersos. *Escherichia coli*. Nitroredutase. Microssoma do fígado de rato. Polímeros molecularmente impressos. LC-MS/MS.

ABSTRACT

Synthetic azo dyes have been a matter of great concern due to the genotoxic and mutagenic potential of the products originating from azo dye biotransformation. Thus, in recent years the result of the intake of these dyes present in drinking water supplied to a population is discussed by several authors. This work evaluates the action of rat liver microsomes, reducing enzymes produced by the *Escherichia coli* (*E. coli*) and nitroreductase immobilized on biotransformation of three disperse dyes bearing azo groups, namely Disperse Red 73 (DR 73), Disperse Red 78 (DR 78), and Disperse Red 167 (DR 167). UV-Vis spectrophotometry, high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) were techniques used to identify the main products generated after the process degradation of dyes. Magnetic molecularly imprinted polymers (MMIPs) were investigated using precipitation polymerization reactions for preconcentration of the dye DR 73, together with the photoelectrocatalysis degradation and subsequent analysis of the products by LC-MS/MS. *In vitro* studies of biotransformation metabolism of textile dyes with rat liver microsome showed that the reactions occur preferentially in the group of azo and nitro dyes, indicating the reduction of these groups by enzymes of the cytochrome P-450. There were obtained two degradation products for each dye after reaction with *E. coli*; the dye DR 73 gave the product 3 - ((4-aminophenyl) (ethyl) amino) propanitrila and 4-nitroaniline, the product 3 - ((4-aminophenyl) (ethyl) amino) propanitrila and 2-chloro-4-nitroaniline were obtained after reaction with the dye DR78 and DR 167 gave 3,3'-dimethyl-((3-acetamido-4-aminophenyl) azanediyl) dipropanoato and 2-chloro-4-nitroaniline; indicating cleavage of the azo group, possibly by azoreductase enzyme produced by bacteria. The nitroreductase enzyme immobilized on modified magnetic particles Tosyl showed that the reduction of dyes occurred preferentially in the nitro group, while the free enzyme in the reaction medium resulted in more than a product of biotransformation for each dye, acting in more than one site of the molecule, proving the efficacy of enzyme immobilization for biotransformation studies and formation of major products. The mutagenicity of the dyes was evaluated by the *Salmonella*/microsome assay performed on strains TA 98 and TA 100, with and without S9. According to this assay, DR 73 was the most mutagenic. The MMIP to the dye DR 73 showed excellent rebinding values (16 mg g⁻¹ and 6 mg g⁻¹, for MMIP and MNIP, respectively) indicating that the molecularly imprinted polymer formed cavities for specific dye retention. Through the results obtained by LC-MS/MS, it was observed 100% dye degradation in 60 min treatment for more dilute solutions thereof, proving the efficiency of technique in pollutant degradation. Thus, these results suggest that MMIP showed excellent specificity and selectivity for the dye DR 73 and a promising technique in capturing mutagenic dyes of surface water, with great potential for application and operation in the pre-concentration before treatment. Moreover, the reduction of these dyes by biological systems is a major environmental concern due to increased of genotoxicity for living beings, especially humans, producing harmful compounds, such as condemned amines by the International Agency for Research on Cancer.

Keywords: Disperse dyes. *Escherichia coli*. Nitroreductase. Rat liver microsome. Molecularly imprinted polymers. LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de biotransformação dos corantes dispersos após ingestão no organismo humano.	30
Figura 2 - Esquema do primeiro passo catabólico para corantes azo.	33
Figura 3 - Reações de redução do grupo nitro.	34
Figura 4 - Esquema da síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP).	36
Figura 5 - Estrutura do etileno-glicol-dimetacrilato (EGDMA).	37
Figura 6 - Estrutura dos corantes Disperse Red 73 (DR 73) (I), Disperse Red 78 (DR 78) (II) e 167 Disperse Red (DR 167) (III).	39
Figura 7 - A representação da estratégia sintética para MMIPs do DR73 pelo método de precipitação de polimerização.	49
Figura 8 - Espectros de absorção na região do UV-Vis na concentração de $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes: Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em dissolução com acetonitrila.	52
Figura 9 - Curvas analíticas obtidas para os corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila.	53
Figura 10 - Cromatograma CLAE-DAD obtido para $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em meio acetonitrila obtidos em coluna C18, fase móvel 80:20 ACN/H ₂ O. vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. T= 30 °C. Detecção: $\lambda = 509 \text{ nm}$; 483 nm e 510 nm correspondentes à: Disperse red 73, Disperse red 78 e Disperse red 167, respectivamente.	55
Figura 11 - Curvas analíticas obtidas para os corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila.	56
Figura 12 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) do corante padrão Disperse Red 73, tampão de fosfato e NADPH e B) Espectro de massas MS/MS do corante padrão Disperse Red 73 protonado.	61
Figura 13 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) do corante padrão Disperse Red 78, tampão de fosfato e NADPH e B) Espectro de massas MS/MS do corante padrão Disperse Red 78 protonado.	61

Figura 14 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) do corante padrão Disperse Red 167, tampão de fosfato e NADPH e B) Espectro de massas MS/MS do corante padrão Disperse Red 167 protonado..... 62

Figura 15 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 73 antes da reação com microssoma e B) após reação com microssoma; picos cromatográficos com $t_r = 3,41$ min (metabólito 1) e $t_r = 3,09$ min (metabólito 2). 63

Figura 16 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 319 ($[M + H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 319..... 65

Figura 17 - Fragmentação proposta para o metabólito (1) m/z 319, formado após a incubação de 5 mg L^{-1} do corante padrão DR 73 com microssoma de fígado de rato. 66

Figura 18 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 351 ($[M + H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 351..... 67

Figura 19 - Fragmentação proposta para o metabólito (2) m/z 351, formado após a incubação de 5 mg L^{-1} do corante padrão DR 73 com microssoma de fígado de rato. 68

Figura 20 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 78 antes da reação com microssoma e B) após reação com microssoma; picos cromatográficos com $t_r = 3,86$ min (metabólito 3). 69

Figura 21 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 328 ($[M + H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 328..... 71

Figura 22 - Fragmentação proposta para o metabólito (3) m/z 328, formado após a incubação de 5 mg L^{-1} do corante padrão DR 78 com microssoma de fígado de rato. 72

Figura 23 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 167 antes da reação com microssoma e B) após reação com microssoma; picos cromatográficos com $t_r = 4,56$ min (metabólito 4) e $t_r = 4,21$ min (metabólito 5). 73

Figura 24 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 508 ($[M + H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 508..... 74

Figura 25 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 435 ($[M + H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 435..... 76

Figura 26 - Fragmentação proposta para o metabólito (5) m/z 435, formado após a incubação de 5 mg L⁻¹ do corante padrão DR 167 com microsoma de fígado de rato. 77

Figura 27 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos corantes: Disperse Red 73 (A) Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em uma concentração de 100 mg L⁻¹ antes (em vermelho) e após (em preto) incubação com bactéria *E. coli*..... 81

Figura 28 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD: 20 mg L⁻¹ de corantes têxteis após biotransformação com a bactéria *E. coli* (pico 1) e 20 mg L⁻¹ de corante padrão (pico 2): Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila. Condições: Coluna C18, fase móvel de 80:20 ACN/H₂O. Vazão = 1,0 ml min⁻¹. T = 30 ° C. Inserte: Espectros de UV-Vis obtidos para cada pico antes (preto) e após (vermelho) ação enzimática..... 82

Figura 29 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante na A) ausência de bactéria *E. coli* e B) presença da bactéria *E. coli*..... 84

Figura 30 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 190 ($[M+H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com a *E. coli*. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 190..... 86

Figura 31 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 190, formado depois da reação com 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 73 incubado com a *E. coli*, em condições estáticas, a 30 °C durante sete dias..... 87

Figura 32 - Cromatograma de íons totais (TIC) das duas transições para 4-nitroanilina presentes na amostra experimento (após biotransformação com *E. coli*)..... 88

Figura 33 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante na A) ausência de bactéria *E. coli* e B) presença da bactéria *E. coli*..... 90

Figura 34 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 190 ($[M+H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com a *E. coli*. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 190..... 91

Figura 35 - Cromatograma de íons totais (TIC) das duas transições para 2-cloro-4-nitroanilina presentes na amostra experimento (após biotransformação com *E. coli*)..... 92

Figura 36 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L ⁻¹ do corante na A) ausência de bactéria <i>E. coli</i> e B) presença da bactéria <i>E. coli</i>	94
Figura 37 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de <i>m/z</i> 338 ([M+H] ⁺) para o corante DR 167 após biotransformação com a <i>E. coli</i> . B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, <i>m/z</i> 338.....	95
Figura 38 - Fragmentação proposta para o metabólito <i>m/z</i> 338, formado depois da reação com 20 mg L ⁻¹ do corante padrão DR 167 incubado com a <i>E. coli</i> , em condições estáticas, a 30 °C durante sete dias.....	96
Figura 39 - Cromatograma de íons totais (TIC) das duas transições para 2-cloro-4-nitroanilina presentes na amostra experimento (após biotransformação com <i>E. coli</i>)......	97
Figura 40 - Cromatogramas de CLAE-DAD registrados para 20 mg L ⁻¹ dos corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila obtida através da coluna C-18, fase móvel 80:20 ACN / H ₂ O.vazão = 1,0 ml min ⁻¹ .T = 30 ° C. Detecção: λ = 510 nm; 488 nm e 512 nm, para Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167, respectivamente. Inserte: Espectros de UV-Vis obtidos para cada pico antes (preto) e após (vermelho) ação enzimática.....	100
Figura 41 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L ⁻¹ do corante A) antes da reação com nitroredutase (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroredutase.	102
Figura 42 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de <i>m/z</i> 319 ([M+H] ⁺) para o corante DR 73 após biotransformação com a nitroredutase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, <i>m/z</i> 319.	103
Figura 43 - Fragmentação proposta para o metabólito <i>m/z</i> 319, formado após a incubação de 20 mg L ⁻¹ do corante padrão DR 73 com a enzima nitroredutase.	104
Figura 44 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L ⁻¹ do corante A) antes da reação com nitroredutase (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroredutase.	105
Figura 45 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺) para o corante DR 78 após biotransformação com a nitroredutase. B) Espectros de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, <i>m/z</i> 328.....	106
Figura 46 - Fragmentação proposta para o metabólito <i>m/z</i> 328, formado após a incubação de 20 mg L ⁻¹ do corante padrão DR 78 com a enzima nitroredutase.	107

Figura 47 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 324 ($[M+H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 324. 108

Figura 48 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 324, formado após a incubação de 20 mg L^{-1} do corante padrão DR 78 com a enzima nitroreductase. 109

Figura 49 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L^{-1} do corante A) antes da reação com nitroreductase (amostra diluída 2 vezes) e B) após reação com nitroreductase. 110

Figura 50 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 476 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 476. 111

Figura 51 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 476, formado após a incubação de 20 mg L^{-1} do corante padrão DR 167 com a enzima nitroreductase. 112

Figura 52 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 464 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 464. 113

Figura 53 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 464, formado após a incubação de 20 mg L^{-1} do corante padrão DR 167 com a enzima nitroreductase. 114

Figura 54 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 472 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 472. 115

Figura 55 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 472, formado após a incubação de 20 mg L^{-1} do corante padrão DR 167 com a enzima nitroreductase. 116

Figura 56 - Cromatogramas de CLAE-DAD registrados para 20 mg L^{-1} dos corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila obtida através da coluna C-18, fase móvel 80:20 ACN / H₂O. vazão = $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. T = 30° C . Detecção: $\lambda = 510 \text{ nm}$; 488 nm e 512 nm , para Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167, respectivamente. Inserte: Espectros de UV-Vis obtidos para cada pico antes (preto) e após (vermelho) ação enzimática. 118

Figura 57 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 g L^{-1} do corante A) antes da reação com nitroreductase imobilizada (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroreductase imobilizada. 121

Figura 58 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 319 ($[M+H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com a nitroredutase imobilizada. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 319.....	122
Figura 59 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L^{-1} do corante A) antes da reação com nitroredutase imobilizada (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroredutase imobilizada.	124
Figura 60 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 328 ($[M+H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com a nitroredutase imobilizada. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 328.....	125
Figura 61 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L^{-1} do corante A) antes da reação com nitroredutase imobilizada (amostra diluída duas vezes) B) após reação com nitroredutase imobilizada.....	127
Figura 62 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 476 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroredutase imobilizada. B) espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 476.....	128
Figura 63 - Imagens de SEM de DR73-MMIP (A) e MNIP (B) na amplificação de 30000x.	131
Figura 64 - Imagens de TEM DR73-MMIP (A) and MNIP (B) na amplificação de 5000x.	132
Figura 65 - Isotermas de adsorção do corante DR73 para MMIP (●) e MNIP (★). Condições experimentais: $V = 500 \text{ } \mu\text{L}$ de corante, 2 mg de polímero e 2 h de tempo de equilíbrio.	133
Figura 66 - Representação da ligação do corante no MMIP e MNIP após 2 horas de reação.	134
Figura 67 - Esquema representativo da liberação de corante DR73 previamente adsorvido no MMIP e MNIP após 2 h de reação. Extração com metanol: ácido acético (MeOH / ACH , 1: 9, v / v).	136
Figura 68 - (A) Degradação fotoeletrocatalítica do corante DR73 extraído do MMIP para concentrações iniciais do corante de (★) $2,29 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (●) $8,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curvas de cinética de pseudo-primeira ordem construídas a partir da Curva A.	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^4 do corante DR 73.....	46
Tabela 2 - Matriz de planejamento dos experimentos para planejamento fatorial 2^4	47
Tabela 3 - Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Absorbância vs concentração dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila por espectrofotometria na região do UV-Visível (medidas em triplicata).....	54
Tabela 4 - Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Área vs concentração para os corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila (medidas em triplicata).	56
Tabela 5 - Atividade mutagênica do corante DR 78 nas linhagens TA 98 e TA 100 de <i>Salmonella typhimurium</i> , em ausência e presença de ativação metabólica (S9).....	58
Tabela 6 - Produtos de biotransformação dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 após reação com microsossoma de fígado de rato.....	78
Tabela 7 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 73 com enzimas redutoras produzidas pela <i>E. coli</i>	89
Tabela 8 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 78 com enzimas redutoras produzidas pela <i>E. coli</i>	93
Tabela 9 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 167 com enzimas redutoras produzidas pela <i>E. coli</i>	98
Tabela 10 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 73 com a enzima nitroredutase livre no meio reacional.	104
Tabela 11 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 78 com a enzima nitroredutase livre no meio reacional.	109
Tabela 12 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 167 com a enzima nitroredutase livre no meio reacional.	117
Tabela 13 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 73 com a enzima nitroredutase imobilizada.	123
Tabela 14 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 78 com a enzima nitroredutase.	126
Tabela 15 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 167 com a enzima nitroredutase.	129

Tabela 16 - Porcentagem de degradação dos corantes DR 73, DR 78 e Dr 167 através da área dos cromatogramas totais das amostras de controle e biotransformação.129

Tabela 17 - Comparação da porcentagem de corante liberado no MMIP e MNIP após extração com metanol e ácido acético.135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: Absorbância

ABDB: 2,2'-azo-*bis*-(2,4-dimetilvaleronitrila)

ACN: Acetonitrila

AIBN: 2,2'-azo-*bis*-(2-metilpropionitrila)

CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos

EPI: Cromatograma de íon fragmento

DNA: ácido desoxirribonucleico

DMSO: Dimetilsulfóxido

DR 73: Disperse Red 73

DR 78: Disperse Red 78

DR 167: Disperse Red 167

E. coli: *Escherichia coli*

EGDMA: Etileno-glicol-dimetacrilato

EM: Espectrometria de massas

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

MeOH: Metanol

ME: Monômero estrutural

MF: Monômero funcional

MMIP: Polímeros magnéticos molecularmente impressos

MNIP: Polímeros magnéticos molecularmente não impressos

MPS: 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano

SRM: Selected reaction monitoring

NADPH: β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Q: Quantidade de um determinado soluto adsorvido por uma superfície adsorvente

RN^{2+} : sal de diazônio

SEM: Microscopia eletrônica de varredura

SPE: Extração em fase sólida

TEOS: tetraetoxisilano

TEM: Microscopia eletrônica de transmissão

TIC: Cromatograma de íon totais

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

XIC: Cromatograma de íon extraído

λ : Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	Corantes têxteis	26
1.2	Indústria têxtil.....	27
1.3	Azo corantes	27
1.4	Métodos de remediação de corantes têxteis.....	28
1.5	Rotas de biotransformação e riscos toxicológicos dos corantes dispersos	29
1.6	Biotransformação de corante disperso por enzimas redutoras presentes na flora intestinal.	32
1.7	Método de extração de corantes dispersos por polímeros molecularmente impressos (MIP).....	35
2	OBJETIVOS.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Reagentes e soluções	39
3.2	Instrumentação	40
3.3	Estirpe da bactéria <i>Escherichia coli</i>	42
3.3.1	Condições otimizadas de DR 73, DR 78 e DR 167 em meio de cultura contendo <i>E. coli</i> 43	
3.4	Ensaio de mutagenicidade com <i>Salmonella</i>/microsoma.....	43
3.5	Imobilização da enzima nitroredutase	44
3.5.1	Determinação da quantidade de enzima imobilizada.....	45
3.5.2	Biotransformação de corantes têxteis com a enzima nitroredutase.....	45
3.6	Preparação microsomal.....	46
3.6.1	Planejamento factorial 2⁴	46
3.6.2	Ensaio do metabolismo <i>in vitro</i>.....	47
3.7	Preparação de nanopartículas magnéticas (MNP's)	48
3.7.1	Preparação do MMIPs e MNIPs.....	49
3.7.2	Estudos de ligação e liberação de DR 73 nos polímeros magnéticos.	50

3.7.3	Preparação e caracterização de fotoanodo de TiO ₂ NTs usados em experimentos fotoeletrocatalíticos	50
3.7.4	Degradação fotoeletrocatalítica do corante DR 73 liberado de MMIP	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Características analíticas dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila.....	52
4.2	Análise dos corantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)...	54
4.3	Teste de Ames com corantes do tipo azo DR 73, DR 78 e DR 167.....	57
4.4	Biotransformação <i>in vitro</i> dos corantes têxteis DR 73, DR 78 e DR 167 utilizando microssoma de fígado de rato	59
4.4.1	Corante Disperse Red 73.....	62
4.4.2	Corante Disperse Red 78.....	68
4.4.3	Corante Disperse Red 167.....	73
4.5	Descoloração de DR 73, DR 78 e DR 167 pela ação da <i>Escherichia coli</i>.....	80
4.6	Identificação dos produtos de redução por CLAE-DAD dos corantes DR 73, DR 78 e DR 167 submetidos à reação com <i>Escherichia coli</i>	81
4.7	Identificação dos produtos de redução por LC-MS/MS dos corantes DR 73, DR 78 e DR 167 submetidos à reação com <i>Escherichia coli</i>	83
4.7.1	Corante Disperse Red 73.....	84
4.7.2	Corante Disperse Red 78.....	89
4.7.3	Corante Disperse Red 167.....	94
4.8	Análises dos possíveis metabólitos formados pela reação dos corantes DR 73, DR 78 e DR 167 com a enzima nitroredutase.	99
4.8.1.1	Biotransformação do corante DR 78 pela ação da nitroredutase em solução.....	104
4.8.1.2	Biotransformação do corante DR 167 pela ação da nitroredutase em solução.....	110
4.8.2	Imobilização da enzima nitroredutase.....	118
4.8.3	Análise dos produtos de DR 73, DR 78 e DR 167 submetidos à reação com nitroredutase imobilizada por CLAE-DAD.....	118
4.8.3.1	Ação da enzima nitroredutase imobilizada sobre o corante DR 73	120
4.8.3.2	Ação da enzima nitroredutase imobilizada sobre o corante DR 78	123
4.8.3.3	Ação da enzima nitroredutase imobilizada sobre o corante DR 167	126
4.9	Aprisionamento e liberação do corante DR 73 em MMIP	130
4.10	Características morfológicas do DR73-MMIP	130

4.11	Ligação do corante nos MIPs magnéticos.....	132
4.12	Liberação do corante DR 73 retido nos MIPs magnéticos.....	135
4.13	Oxidação fotoeletrocatalítica do corante Disperse Red 73 após a extração do corante em águas residuais com MMIP	136
5	CONCLUSÕES	139
	REFERÊNCIAS.....	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Corantes têxteis

O uso da cor tem papel importante em nossa vida desde os primórdios da civilização. Os caçadores do período Glacial já pintavam as paredes das cavernas reservadas ao culto, com fuligem e ocre, criando obras que resistiram milhares de anos. Até a metade do século XIX, só existiam pigmentos naturais, provenientes de vegetais, insetos, moluscos e minerais. Entretanto, muitos corantes naturais utilizados na antiguidade ainda são empregados em larga escala, como é o caso do índigo, pigmento azul extraído da *Indigofera tinctoria*; a alizarina - pigmento vermelho extraído da raiz da garança (*Rubia tinctorum*) e a henna - pigmento castanho-avermelhado extraído da Henna (*Lawsonia inermis*), a qual é utilizada na indústria de cosméticos. (1)

Os corantes, geralmente, são materiais aplicados em solução e se fixam ao substrato, como, por exemplo, cabelo, papel, tecido e couro. Os corantes devem ser estáveis à luz e aos processos de lavagem, além de apresentar fixação uniforme às fibras do substrato. (2) Estas características são consideradas essenciais e só foram obtidas com o desenvolvimento dos corantes sintéticos.

O primeiro corante orgânico sintetizado foi a malveína, obtida a partir da oxidação da anilina (C_6H_7N) com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em 1856, por William H. Perkin (3) e extremamente difundido nos tempos atuais.

A classificação dos corantes pode basear-se no seu grupo cromóforo, tais como: azo, antraquinona, polimetino, nitro, nitroso, arilmetano, xanteno, cumarino e outros. (4-6) Por outro lado, também pode ser classificado pelo modo de fixação. Considerando os diferentes tipos de fibras (naturais e sintéticas) neste tipo de classificação encontram-se os corantes reativos, corantes diretos, corantes ácidos, corantes à cuba, corantes de enxofre, corantes dispersos, corantes pré-metalizados e corantes branqueadores. (7)

Todos os anos centenas de novos compostos coloridos são descritos na literatura para uma multiplicidade de aplicações seja na indústria têxtil, farmacêutica, de cosméticos, de plásticos, fotográficas, automobilística, de papel e alimentícia. O Colour Index lista mais de 10.000 corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil, sendo as características básicas destes compostos a fidelidade, a persistência e a alta resistência da cor em relação à variação de luz, à lavagem, à transpiração e ao tempo, mas acima de tudo os mesmos devem ser economicamente viáveis. (8)

1.2 Indústria têxtil

Mesmo apresentando enorme faturamento para a economia nacional e mundial e apresentar grande relevância neste setor, a indústria têxtil vem gerando, durante décadas, mais de 700.000 toneladas de 10.000 tipos de corantes e pigmentos anualmente, dos quais 20% são descartados nos efluentes durante o processo de tintura e durante o processo de produção do corante. (9,10) Alguns estudos apontam que cerca de meia tonelada desta classe de compostos é lançada ao dia no meio ambiente. (11) Muitos destes resíduos de corantes sintéticos não são tratados com sucesso pelos métodos convencionais devido a sua estrutura complexa e a diversificação da matriz durante o processo de tintura, o que pode acarretar problemas ambientais. (11)

Os corantes ácidos, reativos e dispersos apresentam como principal problema a coloração dos efluentes, que ocorre particularmente pela baixa eficiência de fixação do corante à fibra, contribuindo para o descarte destas espécies nos efluentes têxteis. (11)

No entanto, de todos os tipos de corante têxtil, um grande problema evidenciado na indústria têxtil é a aplicação dos corantes dispersos, pois estes apresentam baixa solubilidade em água, o que favorece a perda de 50 % do mesmo durante a etapa de tintura. (12) Somado a geração de resíduos altamente coloridos e com grande carga orgânica, o setor têxtil ainda consome uma grande quantidade de água. (13)

Nos últimos anos alguns autores têm demonstrado que a indústria têxtil também é responsável por produzir alguns efluentes genotóxicos, devido às atividades mutagênicas de alguns corantes e/ou metabólitos. (14-16) Alguns estudos têm associado alguns corantes com o câncer de bexiga em humanos, alguns sarcomas, hepatocarcinomas, anomalias nucleares em experimentos com animais e aberrações cromossômicas em células de mamíferos. (13,17)

1.3 Azo corantes

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes com o intuito de obter diferentes tonalidades do mesmo. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azo corantes, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupos azos ($-N=N-$) ligados a sistemas aromáticos. (18) Mais da metade dos corantes produzidos anualmente pertencem a esse grupo. Presumivelmente mais de 3000 diferentes azo corantes são usados para tingir vários materiais, sendo que a maior parte é empregada em tingimento de tecidos. (19) Essa grande utilização se deve ao fato desses corantes permitirem um método de tingimento de fibras celulósicas (especificamente

alongadas) com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade em relação às outras classes. (20) O grupo faz parte de diferentes tipos de corantes, os quais são classificados como: reativos, ácidos, diretos, dispersos, entre outros. (20)

Dentre estes, os corantes dispersos são pouco solúveis em água e utilizados na tintura de fibras sintéticas e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão (partículas entre 1 a 4 μm). Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias carbônicas (hidrofóbicas) com um grupo hidrofílico em uma de suas extremidades, que normalmente estabilizam a suspensão do corante. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tinturas de fibras sintéticas, tais como: acetato de celulose, nylon, poliéster e poliácrlonitrila. (21)

Aproximadamente 50 % dos corantes dispersos comerciais são constituídos por grupos funcionais monoazo, 25 % são antraquinonas, 10 % são disazo e outros grupos como benzimidazol, derivados de naftóis constituem o restante. Este grupo de corantes tem atraído atenção, uma vez que grande parte desses corantes é baseado em compostos contendo a função azo-aromático como cromóforos. (21,22)

1.4 Métodos de remediação de corantes têxteis

A busca por novos métodos de remoção e destruição de poluentes em águas residuárias e naturais tem requerido a atenção dos pesquisadores. A seleção destes novos métodos baseia-se na composição e na natureza da solução a ser tratada, na estabilidade dos materiais utilizados durante o processo, no custo, na seletividade do método e em especial na compatibilidade destes materiais e do processo com o meio ambiente. Por isso faz-se necessário desenvolver processos e materiais eficientes e econômicos para destruir estes poluentes, seus precursores e subprodutos. (4)

Muitos destes resíduos de corantes sintéticos não são tratados com sucesso por métodos convencionais, tais como sistemas municipais de tratamento aeróbico. (23,24) Este fato, juntamente com exigências mais restritas para os padrões de descarga de efluentes, levou a esforços recentes da investigação para métodos de tratamento mais eficientes. Neste sentido, várias técnicas de descontaminação têm sido propostas por vários autores. (25)

1.5 Rotas de biotransformação e riscos toxicológicos dos corantes dispersos

O progresso tecnológico nos últimos anos tem desenvolvido uma grande quantidade de novos xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico), que embora sejam adotados pela indústria com grande sucesso tem também levantado algumas preocupações como contaminantes ambientais. (26) Entre eles, os corantes azo, por exemplo, podem apresentar-se como substâncias genotóxicas e com potencial mutagênico. Isto depende da natureza dos substituintes no anel aromático ligados por um ou mais grupos azo na molécula. (14) Entretanto, as modificações causadas por reações de redução, oxidação, acetilação ou cloração, algumas vezes, formam compostos muito mais mutagênicos e danosos ao ambiente e saúde humana.

É conhecido da literatura (27) que muitos poluentes ambientais, tais como corantes do tipo azo, são mutagênicos e suspeitos de causar câncer. Embora o processo de carcinogênese seja muito complexo sabe-se que algumas substâncias carcinogênicas podem converter uma célula normal em célula maligna quando exposta repetitivamente ao mutágeno ou a carcinogenicidade pode ser gerada pela formação de ligações covalentes aos sítios de DNA após ser ativado metabolicamente pelo citocromo P-450. (28,29) Usualmente, carcinógenos são substâncias eletrofílicas que reagem com DNA antes ou após processo de metabolização levando a formação de adutos. Por outro lado, adutos com elétrons desemparelhados podem levar a mutações após replicação do DNA e são capazes de começar processos de carcinogênese. (30,31)

Deste modo, nos últimos anos a consequência da ingestão destes corantes presentes mesmo em água de abastecimento público é discutida por diversos autores. (14) Os riscos toxicológicos de corantes sintéticos a saúde humana estão intrinsecamente relacionados aos processos de biotransformação potencializados pelo modo e tempo de exposição ao homem, ingestão oral, sensibilização da pele, sensibilização das vias respiratórias e etc. (14,27)

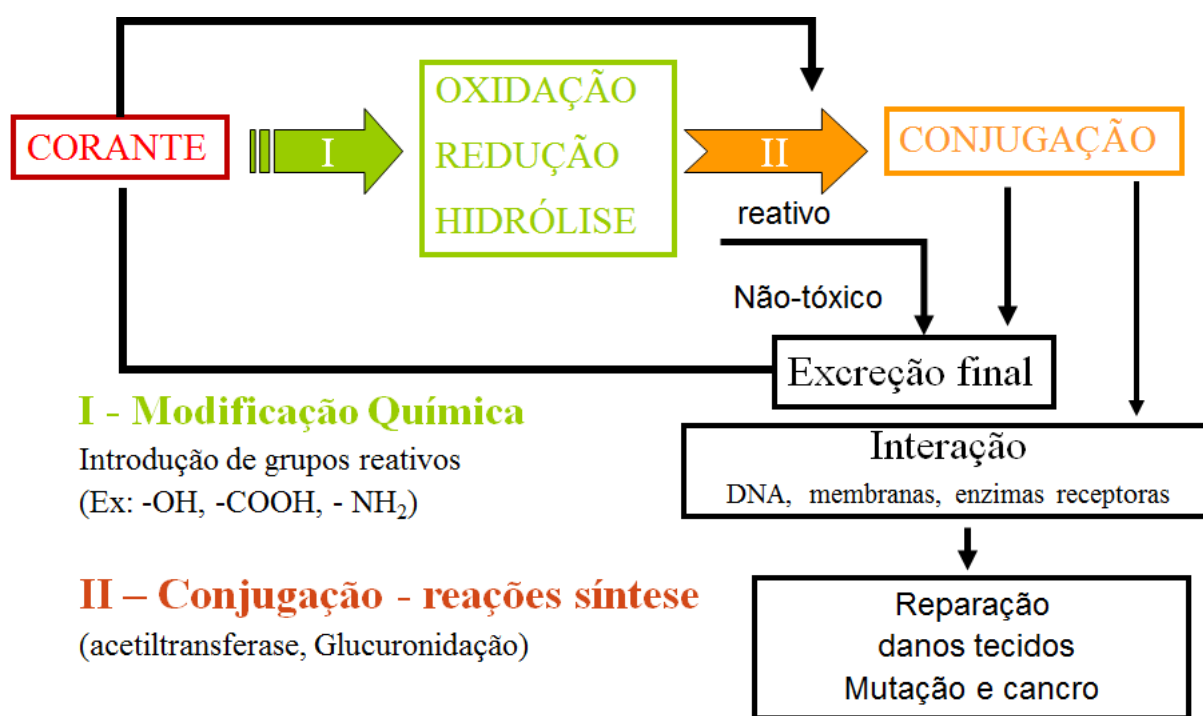
O processo de biotransformação de um corante como outros xenobióticos pode afetar o perfil toxicológico do corante e promover a detoxificação e excreção, mas também a bioativação do mesmo. Por esta razão, o estudo de biotransformação dos xenobióticos é um fator primordial nos estágios iniciais de avaliação dos seus riscos. A biotransformação ocorre em vários tecidos, sendo o fígado o mais importante. (14,27)

Stiborova e os co-autores estudaram (32) a biotransformação do corante azo (Sudão I) por enzimas microsossomais de fígado de ratos por meio de experimentos *in vitro*. Observou-se a formação do íon benzenodiazônio por clivagem oxidativa do grupo azo de Sudão I pelas

enzimas microsossomais. Assim, os hidroxiderivados identificados não são potenciais cancerígenos, porém, são muito reativos e reagem rapidamente com o nucleófilo das células, formando íons nitrênio, que se ligam ao DNA e possuem propriedades carcinogênicas. (33)

Entre os vários sistemas enzimáticos responsáveis pelos processos metabólicos as principais rotas de biotransformação de corantes azo envolve citocromo P-450. As enzimas P-450 pertencem a uma superfamília de heme proteínas que estão presentes em todos os organismos vivos. Estão envolvidas no metabolismo de uma ampla variedade de compostos químicos e possuem a capacidade de catalizar reações oxidativas e redutivas de xenobióticos. (34,35) Exemplo dessas reações são mostrados na Figura 1 a seguir.

Figura 1 - Rotas de biotransformação dos corantes dispersos após ingestão no organismo humano.



Fonte: autor do trabalho.

De acordo com Hunger (36), a redução de corantes azo pode ocorrer no fígado, via citocromo P-450, gerando produtos com propriedades carcinogênicas, tais como aminas aromáticas.

A toxicidade e carcinogenicidade de certos corantes azos em mamíferos também é discutida após reações de biotransformação catalisadas por reações enzimáticas, incluindo as catalisadas por azoredutase presente no intestino dos mamíferos. Os produtos gerados podem ser mais ou menos tóxicos que a molécula original. (36-38)

Corantes azos portando estruturas químicas com grupos amino, alquilamino ou acetilamino, sem nenhum grupo sulfonado são ainda mais propensos à intensa ação de um metabolismo oxidativo formando espécies radicalares. Como consequência pode-se formar compostos com alta potencialidade mutagênica ou carcinogênica devido às interações com grupos nucleofílicos das bases nitrogenadas presentes no DNA, mudança de polaridade, ou alteração na lipossolubilidade. (36) O processo não envolve a clivagem da ligação azo, porém leva a reações de hidroxilação durante oxidação catalisada pelo citocromo P-450.

O corante comporta-se como xenobiótico em geral. A rota de biotransformação de um xenobiótico é medida pela fase 1, fase 2 ou uma combinação de ambas. (39) O processo metabólico oxidativo envolvendo o complexo do citocromo P-450 tem o intuito de converter esses corantes em intermediários biológicos menos lipossolúveis. A fase 1 promove mudanças na molécula original, como adição de um grupo funcional, ou seja, reações enzimáticas que adicionam ou modificam os grupos funcionais dos xenobióticos tais como -OH, -SH, -NH₂, ou -COOH através de oxidação, hidroxilação, redução, hidrólise e etc, preparando o xenobiótico para a fase II subsequente. Com isso torna-se possível a fase 2, na qual reações enzimáticas resultam na conjugação de biomoléculas em produtos solúveis em água visando a detoxificação e excreção dos xenobióticos. O objetivo das fases 1 e 2 é de tornar o composto mais polar para facilitar a eliminação do organismo. As fases 1 e 2 não necessariamente ocorrem nessa ordem e também não há a necessidade de ocorrer a fase 1 para ocorrer a fase 2, isso depende do composto que irá se biotransformando e das enzimas presentes. (39-41)

Considerando as dificuldades de correlacionar dados de toxicidade e genotoxicidade de compostos azo *in vitro* e *in vivo* é importante procurar novos dados para ajudar a elucidar o mecanismo de carcinogênese de alguns corantes. (17,42) Nos anos mais recentes diversos modelos para estudos são usados para avaliar a toxicidade de xenobióticos e dentre eles destacam-se as frações S9 usado em testes de Ames. (43,44) A fração S9 é composta por um homogenato de células de fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com a mistura bifenil policlorinada (Aroclor 1254), que induz um aumento de enzimas neste sistema (P-450) neste órgão.

O teste de Ames ou teste de mutação reversa é empregado com sucesso para análise de mutagênese de xenobióticos. (45,46) O teste de mutação reversa utiliza bactérias, ensaio *Salmonella*/microsoma, para detectar uma grande variedade de compostos mutagênicos. A maioria das linhagens bacterianas utilizadas no teste apresenta características que as tornam mais sensíveis para detecção de mutações, incluindo sequências sítio-específicas no DNA que

respondem positivamente para reversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas, ausência do sistema de reparo de DNA livre de erro e plasmídios contendo genes que causam aumento do processo de reparo sujeito a erro. A especificidade das linhagens fornece informações sobre os tipos de mutações que são induzidas por agentes genotóxicos. (45,46)

Nos anos mais recentes Umbuzeiro e colaboradores (15,16) mostraram que alguns corantes do tipo disperso tais como: Disperse Blue 373, Disperse Violet 93, Disperse Orange 37 e Disperse Blue 291 mostraram altas repostas mutagênicas, que são muito maiores em testes usando linhagens do tipo YG 1041 e TA 98 com S9, respectivamente.

O aumento da resposta mutagênica nestas condições ocorre provavelmente pelos grupos nitro presentes nestes corantes que poderiam estar sendo reduzidos em compostos mais mutagênicos após sua transformação nestas linhagens ricas em nitroredutase e acetiltransferase. (15) A ocorrência de substituintes amino na molécula também poderia auxiliar no aumento da mutagenicidade quando na mistura S9, que promove reações de biotransformação usando uma mistura de enzimas nitroredutase e azoredutase presente na composição do extrato de fígado de rato usado nestes testes. Deste modo, embora não se consiga separar os efeitos das duas enzimas na mudança estrutural do corante observa-se que o complexo isoenzimático citocromo P-450 (S9) tem um efeito muito marcante no aumento da atividade mutagênica. (15)

Assim, o ensaio *Salmonella*/microsoma, é uma ferramenta importante capaz de prever os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria, com características metabólicas similares à flora intestinal de mamíferos. (46)

1.6 Biotransformação de corante disperso por enzimas redutoras presentes na flora intestinal.

Alguns autores afirmam que a toxicidade e a carcinogenicidade de certos corantes azo em mamíferos podem resultar da sua biotransformação catalisada por reações enzimáticas, incluindo as catalisadas por azoredutase e nitroredutase presentes no intestino dos mamíferos. (37)

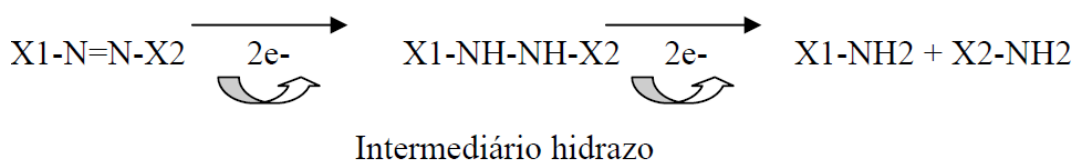
Deste modo, embora alguns corantes azo não apresentem mutagenicidade durante o ensaio de placas do Teste de Ames (47), eles podem ser submetidos à redução por azoredutases (48) e gerar produtos com diferente atividade mutagênica.

Azoredutases são produzidas pela microflora intestinal ou por enzimas presentes no citoplasma de células de mamífero, tais como as enzimas que pertencem à família do citocromo P-450 (49), além disso, a biodegradação bacteriana de corantes azo iniciada com clivagem de ligações azo por azoredutases resulta na formação de aminas, que atuam como agentes cancerígenos humanos. (48-52)

Azoredutases são enzimas isoladas a partir de várias bactérias que catalisam a clivagem redutora da ligação azo com NADH/NADPH como um doador de elétrons. É expressa como a enzima chave para degradação de todos os corantes do tipo azo por bactérias (53).

Durante esta reação, um intermediário hidrazo pode ser formado, como mostra a Figura 2:

Figura 2 - Esquema do primeiro passo catabólico para corantes azo.



Fonte: Chung (1993, p. 528).

Elisangela Franciscan *et al.* (54) estudaram a bactéria facultativa *Staphylococcus arlettae*, isolada a partir de um processo de lamas ativadas em uma indústria têxtil, e observou-se 97% de descoloração de corantes azo sob condições de microaerofilia, que se refere à baixíssimas concentrações de oxigênio durante o processo. A presença da amina aromática na fase microaerofílica e a sua ausência na fase aeróbia indicaram a presença da atividade da azoredutase e biodegradação oxidativa, respectivamente. Os resultados indicaram que usando a estirpe da bactéria houve a formação de aminas aromáticas proveniente da redução do grupo azo. (54)

Outro estudo (55) avaliou a biodegradação do corante azo comercial Disperse Red 1 através da inoculação de um consórcio microbiano, previamente selecionado para degradar o corante azo, em um reator anaeróbio-aeróbio. A análise por LC-ESI-MS/MS do efluente tratado mostrou a formação de novos produtos de degradação através da clivagem e redução do grupo azo, possivelmente pela ação da azoredutase produzida pelo consórcio microbiano. Os testes de toxicidade realizados com *Daphnia similis* e *Hydra attenuata* no efluente tratado

mostrou que a toxicidade foi reduzida significativamente. Contudo, após o tratamento, foi observada apenas pequena mutagenicidade. Os resultados obtidos mostraram que o consórcio bacteriano foi eficaz na biodegradação do corante Disperse Red 1 e também na redução da toxicidade e mutagenicidade através dos testes bacterianos. (55)

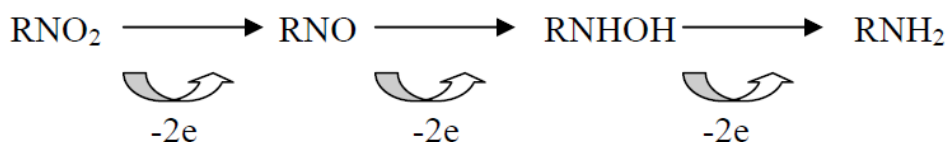
Estas pesquisas sugerem que azoredução é um mecanismo específico para cada linhagem bacteriana, e que pode ser realizada por azoredutases, as quais estão classificadas como enzimas do tipo oxidorredutases.

Oxidoreductases são as enzimas que catalisam reações de oxidação-redução. O substrato oxidado é um hidrogênio ou doador de elétron. O nome mais comum é “desidrogenase” (sempre que possível). “Oxidase” é também usado quando o O_2 é um aceptor. São classificadas em sub-classes pois atuam em diferentes grupos doadores ou aceptores. (56) No caso das oxidoreductases, são 22 sub-grupos, dos quais, azoredutase e nitroredutase fazem parte.

Por outro lado, a atividade das nitroredutases, também classificada no grupo de enzimas oxidoreductases, está associada a uma diversidade de enzimas tais como xantina oxidase, aldeído oxidase, flavoproteínas, e NADPH-CYP-450 e algumas isorformas do citocromo P450, como CYP1A1, CYP3A4 e CYP2B10 (56), ou seja, existem múltiplos mecanismos envolvidos na atividade de nitroredução (56).

Os compostos nitro ($-NO_2$) podem sofrer três tipos de redução: 1) de $-NO_2$ a nitroso (NO), hidroxilamina ($-NHOH$) e finalmente a amina primária ($-NH_2$) (57). Estes três tipos de reações estão representados nas equações que se seguem como mostra a Figura 3:

Figura 3 - Reações de redução do grupo nitro.



Fonte: Chung (1993, p. 528).

A nitroredutase forma um grupo de enzimas que têm um papel central na redução de grupos nitro em nitrocompostos (58) e pode converter compostos nitro aromáticos a aminas aromáticas, formando compostos nitroso e N-hidroxi, reconhecidamente carcinogênicos. (59)

A toxicidade dos nitro compostos está associada com os produtos formados durante a redução dos grupos nitro. Os derivados hidroxilaminos podem interagir com biomoléculas, incluindo DNA, causando efeitos tóxicos e mutagênicos. Os efeitos tóxicos estão relacionados

com o carácter electrofílico destes derivados, ao passo que os efeitos mutagênicos são, principalmente, devido à formação de adutos através da esterificação com guanina. (60)

Nos sistemas de mamíferos, corantes azo e nitroaromáticos são reduzidos a aminas aromáticas por enzimas de bactérias intestinais e do fígado. (61) Várias bactérias anaeróbias a partir do trato intestinal humano são capazes de reduzir corantes azo e hidrocarbonetos aromáticos nitropolicíclicos para aminas aromáticas correspondentes para enzimas que possuam atividade para azoredutase e nitroredutase. A conversão de corantes azo e nitroaromáticos a aminas aromáticas por microrganismos isolados pode ser verificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massa (LC-MS/MS). (48)

O intestino é um possível órgão-alvo para a carcinogênese após a exposição a corantes azo. (62) A microflora intestinal de seres humanos e outras espécies animais podem reduzir os grupos azo de xenobióticos. (48,52) No entanto, os organismos específicos da microflora intestinal que participam na redução do corante azo são mal compreendidos. (63)

1.7 Método de extração de corantes dispersos por polímeros molecularmente impressos (MIP)

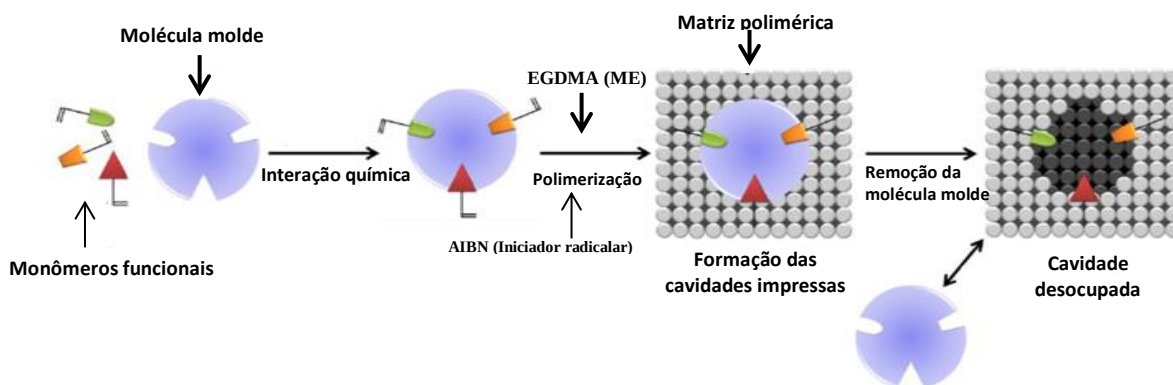
O aumento do uso de técnicas de adsorção é devido à sua eficiência na remoção de poluentes que são estáveis por métodos convencionais. O carvão ativado é o adsorvente mais difundido para a remoção de poluentes das águas residuais. (64) No entanto, adsorventes de baixo custo, tais como resíduos agrícolas sólidos (cascas e serragem) (65), subprodutos industriais (metal hidróxido de lamas, cinzas, lama vermelha, biossólido e suspensão de resíduos) (66), materiais inorgânicos (minerais de argila, materiais silicosos, zeólitos) (64), biossorventes e biomassa microbiana são muito utilizados. (67)

Entre as técnicas de adsorção estudadas para a remoção de compostos nos efluentes, sugere-se algo inovador e promissor, os polímeros molecularmente impressos (MIP). (68,69)

Durante os últimos anos, polímeros molecularmente impressos (MIP) têm sido utilizados como materiais sintéticos que são capazes de religar aos analitos alvo. (70) Os MIPs são polímeros reticulados sintéticos que possuem cavidades específicas projetadas para uma molécula alvo (modelo). (71) Uma vez que o polímero foi formado, a molécula empregada como molde é removida da estrutura polimérica por dissolução, por meio de lavagem com um solvente orgânico. Desta forma, as cavidades do MIP são reveladas e apresentam-se complementares em forma e tamanho ao analito de interesse. Posteriormente, o

solvente utilizado para a remoção da molécula molde é removido por meio de evaporação e os MIP estão prontos para a religação da molécula alvo às cavidades específicas do polímero impresso, possibilitando a sua quantificação. (72) A Figura 4 esquematiza a síntese do MIP e remoção da molécula molde.

Figura 4 - Esquema da síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP).



Fonte: adaptada de HAUPT. (73)

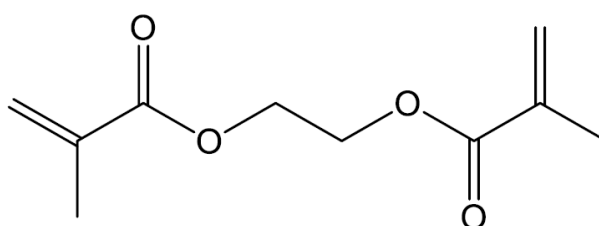
Os MIP são preparados normalmente pelo método *in bulk*, considerado o mais simples, porque é um sistema de preparo homogêneo. Após a polimerização, o material resultante formado é um sólido quebradiço com partículas de tamanhos diferentes. (74)

Para a síntese do MIP, são empregados basicamente cinco compostos: molécula molde, monômero funcional, monômero estrutural, iniciador radicalar e solvente, nos quais, parâmetros como natureza e concentração de cada um dos reagentes é fundamental. (74)

Os MF são responsáveis pelas interações que se estabelecem nos locais de reconhecimento molecular. Nos protocolos de moldagem molecular não-covalente, normalmente é empregado um excesso de monômeros funcionais em relação à quantidade de MM, de modo a favorecer a associação entre o analito e o MF. É muito importante assegurar a complementaridade entre a funcionalidade da molécula-molde e do monômero funcional (por exemplo, um doador de prótons com um aceitador de prótons), de modo a maximizar a formação dos complexos e, portanto, o processo de moldagem molecular do polímero. Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente vários monômeros funcionais com estruturas e polaridades diversas e muitos outros podem ser obtidos com base em processos de síntese racional. (75)

Os monômeros estruturais (ME), também denominados como agente de ligação cruzada ou reticulação, desempenham três funções principais: controlar a morfologia da matriz polimérica, estabilizar os locais de ligação com capacidade de reconhecimento molecular e conferir estabilidade mecânica à matriz polimérica. O etileno-glicol-dimetacrilato (EGDMA), cuja estrutura é apresentada na Figura 5, tem sido o monômero estrutural mais utilizado, por promover a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa. (76)

Figura 5 - Estrutura do etileno-glicol-dimetacrilato (EGDMA).



Fonte: autor do trabalho.

A função do iniciador radicalar é liberar radicais livres para possibilitar o início e a manutenção da reação de polimerização. Dentre os iniciadores mais utilizados estão o 4-3 2,2'-azo-*bis*-(2-metilpropionitrila) (AIBN) e o 2,2'-azo-*bis*-(2,4-dimetilvaleronitrila) (ABDV). (77,78)

Como em outros métodos de adsorção, MIP é capaz de remover os contaminantes da água, porém, não eliminá-los. (68,69) Assim, como o MIP pode adsorver seletivamente um composto orgânico, é possível remover uma molécula alvo específica a partir de uma água residual contaminada e, em seguida, utilizar esse analito alvo em outro meio para degradação, utilizando, como exemplo, processos oxidativos avançados.

Neste caso, propõe-se acoplar o MIP ao processo de remoção de poluentes orgânicos por fotoeletrocatalise, isto é, um processo oxidativo avançado eficaz que é capaz de melhorar a eficiência fotocatalítica pela combinação com um potencial eletroquímico. A escolha de um fotocatalisador adequado é um ponto crucial na fotoeletrocatalise. TiO_2 é o fotocatalisador mais amplamente utilizado, não só pela sua disponibilidade, baixo custo e não toxicidade, mas também porque possui potencial de banda de valência suficiente para a oxidação de $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^\cdot$ a radicais hidroxila ($^\cdot\text{OH}$). (79) Tem sido relatado que a morfologia de eletrodos de nanotubos de TiO_2 é mais adequada, uma vez que possuem uma excelente via de percolação de elétrons

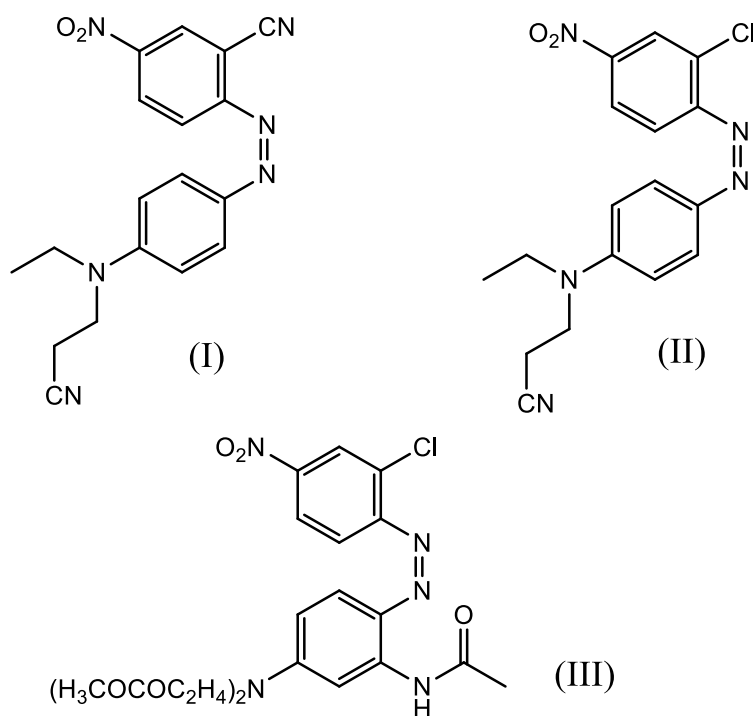
para transferência de carga vetorial, diminuindo, assim, a recombinação de elétron/buraco. (80)

Cada vez mais, a legislação se torna mais rigorosa em relação à remoção de corantes de efluentes industriais, motivando a pesquisa de testes para outras técnicas de tratamento em benefício da indústria têxtil. O processo fotoeletrocatalítico é uma forma eficiente de reduzir a concentração de corantes têxteis (81) e de efluentes têxteis (82) em meio aquoso e adequado para tratar efluentes de águas residuais que chegam à estação de tratamento de esgoto público, em que a concentração de corante é geralmente diluída e a solução corante pode estar presente em baixas concentrações. (83)

2 OBJETIVOS

Investigar o mecanismo de ação de enzimas presentes na microflora intestinal e microsoma hepático em corantes têxteis do tipo azo, tais como: Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 (estrutura química na Fig. 6). Para isto, investigou-se os produtos de biotransformação gerados pela ação de enzimas redutoras, tais como azoredutase, produzidas pela bactéria anaeróbia *Escherichia coli*, enzima nitroredutase imobilizada em nanopartículas magnéticas e reações *in vitro* utilizando microsomas de fígado de rato mediado pelo CYP P-450. Pretende-se ainda contribuir para o estudo de novas metodologias capazes de remover e tratar o corante têxtil Disperse Red 73 (DR 73), usando MIP e oxidação fotoeletrocatalítica. Os corantes e seus produtos de biotransformação serão avaliados por espectrofotometria de UV-Vis, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Figura 6 - Estrutura dos corantes Disperse Red 73 (DR 73) (I), Disperse Red 78 (DR 78) (II) e 167 Disperse Red (DR 167) (III).



Fonte: autor do trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Disperse Red 73 (DR 73), Disperse Red 78 (DR 78) and Disperse Red 167 (DR 167) foram fornecidos pela Classic Dyestuffs Inc®. Os eluentes cromatográficos utilizados foram a acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) grau HPLC, os quais foram adquiridos da Sigma-Aldrich® e água purificada de qualidade Milli-Q ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Para o Teste de Ames, realizado pela doutoranda Gabriela Meireles, orientada pela Prof. Dra. Danielle Palma de Oliveira, no Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), foi utilizada a fração S9, adquirida da Molecular Toxicology Inc. Para o cultivo da bactéria *Escherichia coli*, utilizou-se o meio de sais minerais (MM), pH 7, usado em todas as experiências de lote, que continha: K_2HPO_4 ($1,6 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), NaCl ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($0,02 \text{ g L}^{-1}$) adquiridos da Sigma-Aldrich®. O meio mineral rico (MMR) consistiu de MM suplementado com 100 mg L^{-1} de cada corante, 1 g de L^{-1} de glicose (Sigma-Aldrich®). Tanto

o meio de cultivo para a bactéria contendo sais minerais, quanto o MMR foram submetidos à autoclave a 121°C (Himach CR 21 Hitach) durante 15 min.

Para a imobilização de nitroredutase, utilizada em todas as experiências, empregou-se: tampão borato de 0,01 mol L⁻¹ (pH 8,5), sulfato de amônio 3 mol L⁻¹ em tampão de borato, PBS 0,1% de BSA (pH 7,4), PBS 0,5% de BSA (pH 7,4), β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) e a enzima nitroredutase, que possui uma atividade enzimática de unidades/mg proteína ≥ 100, obtida a partir da *Escherichia coli*, pureza de 90% por SDS-PAGE, recombinante. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O tosil ativado Dynabeads® M-280 foi adquirido da Thermo Fisher Scientific®.

Para as análises com microssoma de fígado de rato utilizou-se: cloreto de sódio, fosfato de sódio, cloreto de magnésio, β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e a sua forma reduzida (NADPH) adquiridos da Sigma-Aldrich®.

Para a síntese de nanopartículas magnéticas, os reagentes utilizados foram: ferro (II), cloreto tetra hidratado (FeCl₂.4H₂O), ferro (III), cloreto hexa hidratado (FeCl₃.6H₂O), NH₄OH; tetraetilortosilicato (TEOS), mataciloxi-propil-trimetoxi silano (MPS), etanol e tolueno foram adquiridos da Sigma-Aldrich®.

Acetonitrila, acetona, metanol, ácido acético (grau analítico), o monômero funcional acrilonitrila, o monômero estrutural dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), e o iniciador radicalar 2,2-azoisobutironitrilo (AIBN) foram adquiridos da VETEC®. Para a remoção do analito da estrutura do MIP utilizou-se uma mistura de metanol e ácido acético (Sigma-Aldrich®).

3.2 Instrumentação

As medidas espectrofotométricas na região do UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro da Hewlett Packard (HP) modelo 8453, interfaciado na faixa espectral de 200 a 800 nm em cubeta de quartzo, da marca Hellma, com capacidade de 3,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm. Os espectros de absorbância na região UV-VIS foram também obtidos a partir da seleção dos picos no próprio cromatograma CLAE-DAD em modo hidrodinâmico.

As análises para detecção de possíveis metabólitos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo (Shimadzu, modelo LC-10AT) equipado com duas bombas e um injetor automático (volume de injeção de 20 µL) acoplado a um detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M10AVP). Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Shimadzu CLC-ODS, C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm, 100 Å) precedido por uma pré-

coluna (Phenomenex Luna C18, de 1 cm x 4,6 mm x 5 μm , 100 Å). As melhores condições experimentais otimizadas sob o modo isocrático foram: fase móvel = ACN/H₂O 80:20 (v/v), vazão = 1,0 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna = 30°C. As soluções foram filtradas em filtro de PTFE de 0,45- μm e o tempo de análise foi de 20 min. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Espectros UV-Vis no modo hidrodinâmico também foram registados para cada um dos picos dos cromatogramas.

As análises de identificação das estruturas dos possíveis metabólitos formados após a degradação dos corantes foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas (CLAE-EM). As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Agilent® 1200 equipado com bomba quaternária Agilent® 1200, amostrador automático de alta eficiência Agilent® 1200 e detector de diodo Agilent® 1260 acoplado com espectrômetro de massas 3200 QTRAP (*Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer*) e coluna Luna C-18 (2), 5 μm (250 mm x 4.6 mm). A mistura de H₂O/ACN 20:80 (v/v) contendo 0,1% de ácido acético a uma vazão de 1 mL min⁻¹ foi utilizado como fase móvel no modo isocrático. O volume de injeção e a temperatura da coluna eram 10 μL and 25°C, respectivamente.

A detecção por espectrometria de massas (3200 QTRAP) foi feita através do experimento de varredura de íons no modo *enhanced* (EMS, enhanced mass scan – utilizando o analisador íon trap linear). Previamente, realizou-se a otimização das condições de ionização e parâmetros da fonte para os corantes padrões. Cada corante foi otimizado individualmente no espectrômetro de massas via infusão direta (seringa automática com vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$). A ionização foi obtida com uma fonte de Turbo Ion Spray (*electrospray*) operando no modo positivo. Experimentos de íons fragmentos (EPI, enhanced product, íon utilizando novamente o íon trap linear) também foram conduzidos para maiores informações estruturais dos possíveis produtos formados. A energia de colisão aplicada variou de 25–50 V.

A avaliação para formação de aminas como subprodutos nos experimentos de biotransformação foram feitas para os corantes DR 73, DR 78 e DR 167. Estes foram submetidos à incubação com a bactéria *E. coli* usando LC-MS/Ms e experimentos específicos de MRM (multiple reaction monitoring). Os compostos alvo, tais como a anilina, a 4-cloroanilina, 2-cloro-4-nitroanilina e 4-nitroanilina, foram otimizadas por infusão direta usando 0,5 ppm destes compostos como padrão (em MeOH/H₂O 1:1 (v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico) a 1.0 $\mu\text{L min}^{-1}$. Para a análise qualitativa, SRM (monitoramento de reação

selecionada) experimentos foram realizados e duas transições de cada composto foram monitorados.

A morfologia e a caracterização da superfície dos polímeros molecularmente impressos (MIP) foram observadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução com fonte de elétrons por emissão de campo (FEG-SEM) Hitachi LTD S-570 (Hitachi LTD, Tokyo, Japan) e microscópio eletrônico de transmissão (FEG-TEM) JEM-2011 (200 kV; acceleration voltage: 80 - 200 kV; EDS Detector Oxford LINCA).

Demais equipamentos utilizados: Homogenizador Ultra-Turrax, Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 e Vortex IKA foram utilizados no Laboratório de Eletroanalítica (NDcom) e a Ultracentrífuga, Hitachi himac CP90WX no Laboratório de Orgânica (Espectrometria de massas).

Empregou-se um pHmetro da marca Digital Gehaka® modelo PG 2000 para a obtenção das medidas de pH.

A bomba a vácuo utilizada foi da marca EIKONAL® (Modelo 131/132).

Empregou-se o sistema Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore®, para a obtenção de água ultrapura.

3.3 Estirpe da bactéria *Escherichia coli*

A estirpe da bactéria *E. coli* (ATCC 25922) utilizada neste estudo, realizado pela Dra. Elisangela Franciscan, pertencia às culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, Brasil. A cultura foi mantida congelada em óleo mineral. A estirpe da *E. coli* foi inoculada em meio de agar nutriente pela técnica de espalhamento em placa. Após o crescimento em placas de agar nutriente, estirpes isoladas foram inoculadas em um meio contendo sais minerais (MM) com 1 g L⁻¹ de glicose e 100 mg L⁻¹ de cada corante, separadamente. As amostras foram incubadas em condições microaerófilas, a 37°C durante sete dias; a descoloração foi monitorada por espectroscopia UV-Vis, diariamente. Após este procedimento, a estirpe bacteriana foi filtrada através de uma membrana de 0,22 µm e selecionada para este estudo. (54) Estas estirpes foram identificadas usando o gene de rRNA 16S e foram depositadas no banco de dados da GenBank. (84)

3.3.1 Condições otimizadas de DR 73, DR 78 e DR 167 em meio de cultura contendo *E. coli*

A amostra contendo corante e bactéria foi transferida para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugadas durante 15 min a 10.000 rpm. Todas as amostras analisadas por LC-MS/MS foram submetidas à extração em fase sólida utilizando-se cartucho Strata-X, 200 mg/3 mL, Phenomenex. Os cartuchos foram ativados com 3 mL de metanol (MeOH), seguida pela adição de 3 mL de água ultrapure para o condicionamento. Depois de condicionar o cartucho, adicionou-se 10 mL da amostra e lavou-se com 10 mL de água. A amostra foi eluída com 2 mL de ACN e 2 mL de MeOH/DCM 50:50 (v/v), em seguida, secou-se lentamente sob um fluxo de N₂. Ressuspendeu-se em 10 mL de ACN, e retirou-se uma alíquota para análise por LC-MS/MS.

3.4 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*/microsoma

O protocolo de pré-incubação foi feito, na presença e na ausência do sistema de metabolização exógeno (mistura S9), de acordo com Maron e Ames (85) e Mortelmans e Zeiger (86) e foi realizado pela aluna de doutorado Gabriela Meireles, Departamento de análises clínicas, toxicológicas e bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Danielle Palma de Oliveira.

Alíquotas de 100 µL de culturas de cada estirpe de *Salmonella typhimurium* (TA 98 e TA 100) (cerca de 10⁹ células/mL), 500 µL de tampão de fosfato de sódio 0,2 M (para ensaio na ausência de ativação metabólica) ou 500 µL de S9 (para ensaio na presença de ativação metabólica) e 100 µL de solução de cada corante foram adicionados em tubos de vidro de 5 mL e incubadas a 37 °C durante 30 minutos sem agitação. Foi utilizado um volume máximo de 100 µL de DMSO (87).

Após incubação, foram adicionados 2,00 mL de top agar em cada tubo que foram vertidos em placa contendo agar mínimo. As placas foram incubadas invertidas por 66 horas a 37°C. Cada experiência foi realizada em triplicata em diferentes dias. Após esse tempo foi realizada a contagem do número de colônias revertentes.

O DMSO (100 mL) foi utilizado como controle negativo. Para as linhagens TA 98 e TA 100, os controles positivos foram o óxido de 4-nitroquinolina (0,05 µg µL⁻¹) e 2-aminoantraceno (0,25 µg µL⁻¹) ambos dissolvidos em DMSO para os ensaios realizados na ausência e na presença do sistema de ativação metabólico, respectivamente. A avaliação

mutagênica com sistema de ativação metabólica (+S9) foi realizada com fração microssômica S9 (S9 mix), preparada a partir do homogeneizado de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254 (MolTox, Boone, EUA), preparada a uma concentração de 4% (v/v), como descrito previamente (85).

Após a contagem do número de revertentes foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada concentração utilizada. Os dados finais obtidos do ensaio foram analisados utilizando-se o programa estatístico Salanal (Salmonella Assay Analysis) versão 1.0 do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA. Tal programa permite avaliar o efeito dose-resposta por meio de cálculos de análise de variância (ANOVA- teste F) entre a medida do número de revertentes nas diferentes concentrações (doses) testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para análise dos dados foi o de Bernstein (87). A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por esse programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por unidade de medida da amostra analisada.

3.5 Imobilização da enzima nitroredutase

Para a imobilização da enzima nitroredutase, adicionou-se em um eppendorf 1 mL de tampão borato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8.5) e 35 μL de partículas magnéticas de Fe_2O_3 modificadas com grupo tosil adquirido da Thermo Fisher Scientific®. A solução foi homogeneizada em vortex e, em seguida, inserida no separador magnético até que a solução se tornasse clara. Após este passo, removeu-se o sobrenadante e lavou-se as partículas novamente. A seguir, 100 μg de nitroredutase (2 mg mL^{-1}) em tampão borato, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8.5) foram adicionados tal que o volume final de tampão e enzima atingisse 140 μL . Em seguida, adicionou-se 100 μL de tampão sulfato de amônio 3 mol L^{-1} . O tubo foi colocado no Thermomixer, a 37°C durante 18 h, a 700 rpm, seguido de homogeneização por vortex e separação magnética. Após a separação magnética, foi adicionado 1 mL de tampão PBS 0,5% BSA, (pH 7,4) e inserção do tubo no Thermomixer de Eppendorf a 37°C durante 2 h a 700 rpm, para bloquear os sítios ativos remanescentes. Lavaram-se as partículas duas vezes com 1 mL de tampão PBS 0.1% BSA, (pH 7,4) e foram ressuspensas em 198 μL de PBS 0.1 % BSA. (88)

3.5.1 Determinação da porcentagem de enzima imobilizada

A quantidade de nitroredutase imobilizada nas partículas de Fe_2O_3 modificadas pelo grupo tosyl foi determinada através do método de Bradford (89). O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 10 mg do corante Comassie Brilliant Blue G 250 (Merck), em uma solução com 5 mL de etanol 95% (Merck) e 10 mL de ácido fosfórico (Merck). A solução foi filtrada a vácuo e o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água destilada, obtendo-se o reagente de Bradford (88). Este reagente foi armazenado sob refrigeração e em frasco âmbar, com tempo de vida médio de 30 dias. A reação entre corante Comassie a nitroredutase (2,5 mL) foi realizada em uma cubeta de poliestireno (descartável), sob agitação e temperatura ambiente. Após reação de 5 minutos as medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-Vis em comprimento de onda de 595 nm (absorbância do corante ligado à enzima). As medidas foram realizadas utilizando-se 2 mL de reagente de Bradford e 0,5 mL de água (branco) e solução enzimática, respectivamente. Os cálculos da quantidade de enzima imobilizada foram realizados pela técnica espectrofotométrica comparando-se o valor de absorbância do sobrenadante da solução de enzima imobilizada (EI) após lavagem das partículas magnéticas com o valor de absorbância da enzima livre em meio reacional (EL). A equação 1 ilustra cálculo para a quantidade de enzima imobilizada.

$$\% \text{ de enzima imobilizada} = \frac{(\text{valor de EL} - \text{valor de EI}) * 100}{\text{valor de EL}}$$

3.5.2 Biotransformação de corantes têxteis com a enzima nitroredutase

Foram realizados dois estudos diferentes para o meio reacional com a enzima nitroredutase: a enzima livre no meio reacional (sem imobilização) e a enzima imobilizada com partículas magnéticas. Ambas as reações foram realizadas em tubos de eppendorf de 2 mL a 37°C. A mistura reacional consistia de 20 µL de cada corante têxtil (20 mg L⁻¹) dissolvido em acetonitrila, 50 µL da enzima nitroredutase (2 mg mL⁻¹), 20 µL de NADPH (10 mg mL⁻¹) e 310 µL de tampão de fosfato (pH 7,0) em um volume final de 400 µL. As soluções foram aquecidas a 90 °C, a 700 rpm por 60 min. (89)

3.6 Preparação microsomal

Os microsossomas de fígado de rato (RLM) foram preparados por centrifugação diferencial de alta velocidade; utilizando ratos Wistar de acordo com Belaz & Oliveira. (91) As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford. (90) As preparações microsossomais foram armazenadas a -80°C até a análise.

3.6.1 Planejamento factorial 2⁴

Os experimentos de biotransformação *in vitro* utilizando corantes têxteis e microsossomas de fígado de rato foram otimizados usando planejamento fatorial fracionário 2⁴ e dezesseis experimentos foram realizados de forma aleatória. Nesta experiência foram investigadas quatro variáveis. Estas variáveis foram avaliadas em dois níveis, um nível mais baixo e um nível mais elevado, tal como descrito na Tabela 1: concentração de corante (2 e 5 µg mL⁻¹); concentração de proteína (10 e 50 mg mL⁻¹); concentração de NADPH (2 e 5 mmol L⁻¹) e o tempo de incubação (60 e 120 min).

Tabela 1- Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial 2⁴ do corante DR 73.

Variáveis	Nível Inferior (-1)	Nível Superior (1)
[corante] (µg mL ⁻¹)	2	5
[microsossoma]* (mg mL ⁻¹)	10	50
[NADPH] (mmol L ⁻¹)	2	5
Tempo de Incubação (min)	60	120

*Microsossoma de fígado de rato Winster

Fonte: autor do trabalho.

Para todas as experiências, o tipo e a concentração de tampão (tampão de fosfato; 10 mmol L⁻¹, pH 7,0) foram mantidos constante. Foram realizados 16 experimentos de biotransformação, com as possíveis combinações dos níveis escolhidos das variáveis estudadas, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Matriz de planejamento dos experimentos para planejamento fatorial 2⁴.

Experimentos	[corante] [µg mL ⁻¹]	[microsoma] [mg mL ⁻¹]	[NADPH] [mmol L ⁻¹]	Tempo de incubação (min)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1

3.6.2 Ensaio do metabolismo *in vitro*

Os experimentos do metabolismo *in vitro* foram realizados em tubos de Eppendorf (2 ml), os quais continham 430 µL de tampão fosfato de potássio monobásico (10 mmol L⁻¹, pH 7,4), 50 µL de fração microsomal (50 mg mL⁻¹) e 10 µL solução de corante (5 µg mL⁻¹), preparado em acetonitrila. (91)

Após uma pré-incubação de 5 minutos a 37°C num banho de água com agitação, a reação foi iniciada pela adição de 10 µL de NADPH (5 mmol L⁻¹) e deixada sob agitação constante à temperatura de 37°C durante 2 horas. O volume de incubação total foi de 500 µL. A reação foi interrompida pela adição de 500 µL de acetonitrila fria, a mistura deixada em repouso num banho de gelo durante 5 minutos e depois foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 minutos. Um volume de 200 µL do sobrenadante foi coletado e diluído com 100 µL de

água, em seguida, retirou-se 10 μ L da solução e analisou-se por LC-MS. Os controles negativos foram preparados, incluindo: a) tampão fosfato com microssoma; b) tampão fosfato com microssoma e NADPH; c) tampão fosfato contendo substrato (corante disperso) e d) tampão fosfato com NADPH. A porcentagem de biotransformação foi calculada comparando a área da amostra biotransformada com a área do controle negativo. (91)

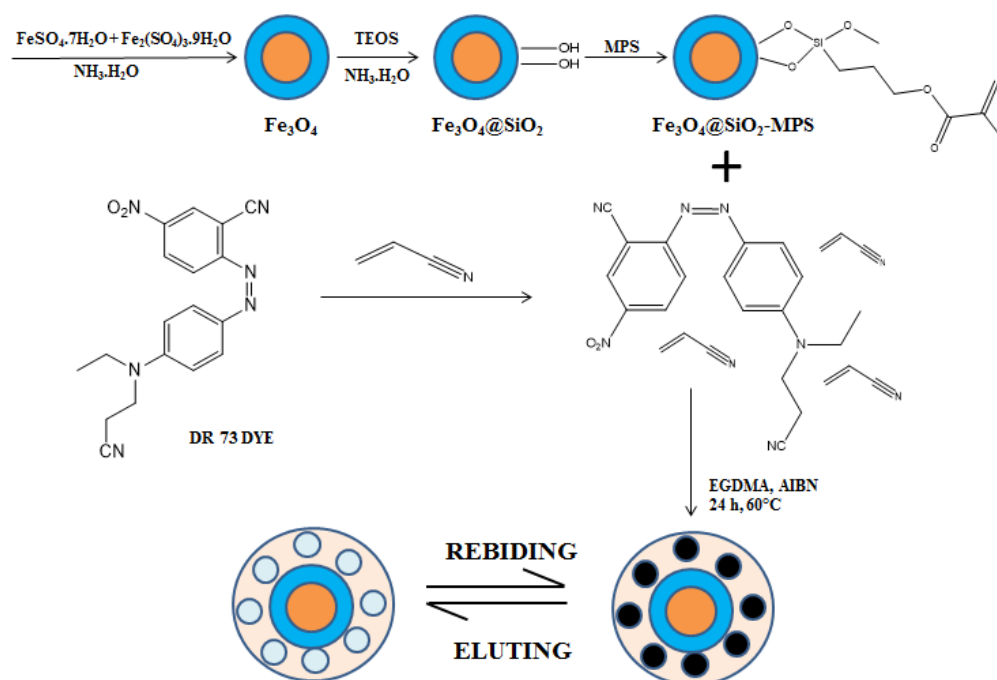
3.7 Preparação de nanopartículas magnéticas (MNP's)

MNPs foram preparadas pelo método de precipitação. (92) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,72 g) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,72 g) foram dissolvidos em 80 mL de água com agitação vigorosa sob condições anaeróbias utilizando nitrogênio. Adicionou-se ao sistema 10 mL de NH_4OH (28 wt. %), gota a gota, e a reação foi mantida a 80°C durante 30 minutos (pH 9-10). O sólido preto (Fe_3O_4) foi separado com um ímã magnético e lavado com água para remoção dos produtos químicos que não reagiram e, em seguida, secou-se no vácuo. As nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 foram modificadas pela mistura de 300 mg de MNPs Fe_3O_4 dispersos em 40 mL de etanol e 4 mL de água ultrapura por ultra-sonicação durante 15 min, seguida da adição de 5,0 mL de NH_4OH e 2,0 mL de tetraetoxisilano (TEOS) para se obter o material $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$. Para isso, a mistura foi deixada a reagir por agitação durante 12 h à temperatura ambiente. O produto foi lavado com água ultrapura e secado no vácuo após ser coletado por separação magnética. (92) Em seguida, a 250 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ foram adicionados 5 mL de 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano (MPS) e 50 mL de tolueno anidro. Após 12 horas sob borbulhamento de nitrogênio, obteve-se como produto o material $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-C=C}$. (92) Após separação magnética, o sólido foi lavado com água ultrapura com subsequente secagem a vácuo.

3.7.1 Preparação do MMIPs e MNIPs

MMIPs foram preparados pelo método de polimerização por precipitação usando 0,8 mmol de monômero funcional acrilonitrila dissolvido em etanol (30,0 mL) e 0,2 mmol do corante têxtil (DR 73). (73-75) A mistura foi agitada a 25 °C durante 12 h para a interação completa entre os reagentes. Em seguida, foram adicionados 200 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-C}=\text{C}$ ao sistema e agitou-se durante 3 horas. Além disso, 4,0 mmol de EGDMA e 0,05 mmol de AIBN foram adicionados ao sistema. A mistura foi submetida à sonicação durante 5 min e a reação foi mantida a 60 °C sob fluxo de nitrogênio durante 24 horas. Após a polimerização, a molécula molde, DR 73, foi removida por extração em Soxhlet utilizando os eluentes, metanol: ácido acético (9:1, v/v); os quais foram substituídos a cada 12 horas durante 4 dias. (73-75) Os MNIPs (polímero não-impresso, sintetizado da mesma forma que o MMIP, no entanto sem adição da molécula molde) foram preparados sob as mesmas condições que os MMIPs, mas sem a adição do corante DR 73. O diagrama esquemático da preparação é mostrado na Figura 7.

Figura 7 - A representação da estratégia sintética para MMIPs do DR73 pelo método de precipitação de polimerização.



Fonte: autor do trabalho.

3.7.2 Estudos de ligação e liberação de DR 73 nos polímeros magnéticos.

A avaliação do desempenho do MIP sintetizado foi realizada por ensaios de adsorção, analisando-se as isotermas de adsorção correspondentes. (92) Para isso, 40 mg de MMIP ou MNIP foram pesados separadamente, em tubos de 15 mL, onde foram adicionados 4 mL de metanol sob agitação durante 3 h. Em seguida, as partículas foram removidas com o auxílio de um ímã magnético, seguido da adição de 4,0 mL de metanol em cada tubo, os quais continham o MMIP e MNIP, sob agitação durante 2 horas, a fim de obter suspensões homogêneas de 10 mg mL^{-1} de polímeros magnéticos. A seguir, à um eppendorf contendo 200 μL das suspensões de MMIP e MNIP foram adicionados 500 μL da solução do corante DR 73 em concentrações entre $1,0 \times 10^{-8}$ até $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e a mistura submetida à agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi separado da porção magnética de cada solução e o estudo da ligação do corante foi avaliado através dos valores de absorbância obtidos por espectrofotometria de UV-Vis. As medidas de UV-Vis foram realizadas no comprimento de onda de máxima absorção do corante DR 73 que é de 509 nm. A comparação dos valores da absorbância foram realizadas para MMIP e MNIP.

O estudo da liberação de corante de MMIP (ou MNIP) foi realizada através da extração do analito com metanol: ácido acético (9: 1, v/v). Após a extração, o sobrenadante foi separado a partir da porção magnética de cada solução e a absorbância foi medida por espectrofotometria de UV-Vis sob $\lambda = 509 \text{ nm}$.

3.7.3 Preparação e caracterização de fotoanodo de TiO_2NTs usados em experimentos fotoeletrocatalíticos

Placas de titânio (Realum, Brasil) com $3 \times 5 \text{ cm}^2$ foram polidas com uma lixa de carboneto de silício com rugosidades sucessivamente mais finas e posteriormente limpas com acetona, isopropanol e finalmente com água ultrapura. Nanotubos de TiO_2 (TiO_2NTs) foram preparados por anodização eletroquímica (30 V durante 50 h) em uma fonte de energia Minipa MPL-1303, usando uma folha de DSA[®] (Denora) (25 cm^2) como contra eletrodo em um eletrólito orgânico constituído por 0,25 % fluoreto de amônio (98%, Synth) em glicerol (99,5 %, Synth) contendo 10 % (v/v) de água Milli-Q. Em seguida, as amostras foram lavadas com água deionizada, secas com nitrogênio e calcinadas a $450 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos em ar, com taxa de aquecimento de $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. (80)

O eletrodo TiO_2NTs foi caracterizado por difração de raios-X (DRX) em um difratômetro de raios-X, Siemens D5000, que opera com a lâmpada Cu - $\text{K}\alpha$, software Difffrac

Plus XRD Commander. A caracterização morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura - Field Emission Gun (FEG-SEM) em um microscópio Jeol 7500F.

3.7.4 Degradação fotoeletrocatalítica do corante DR 73 liberado de MMIP

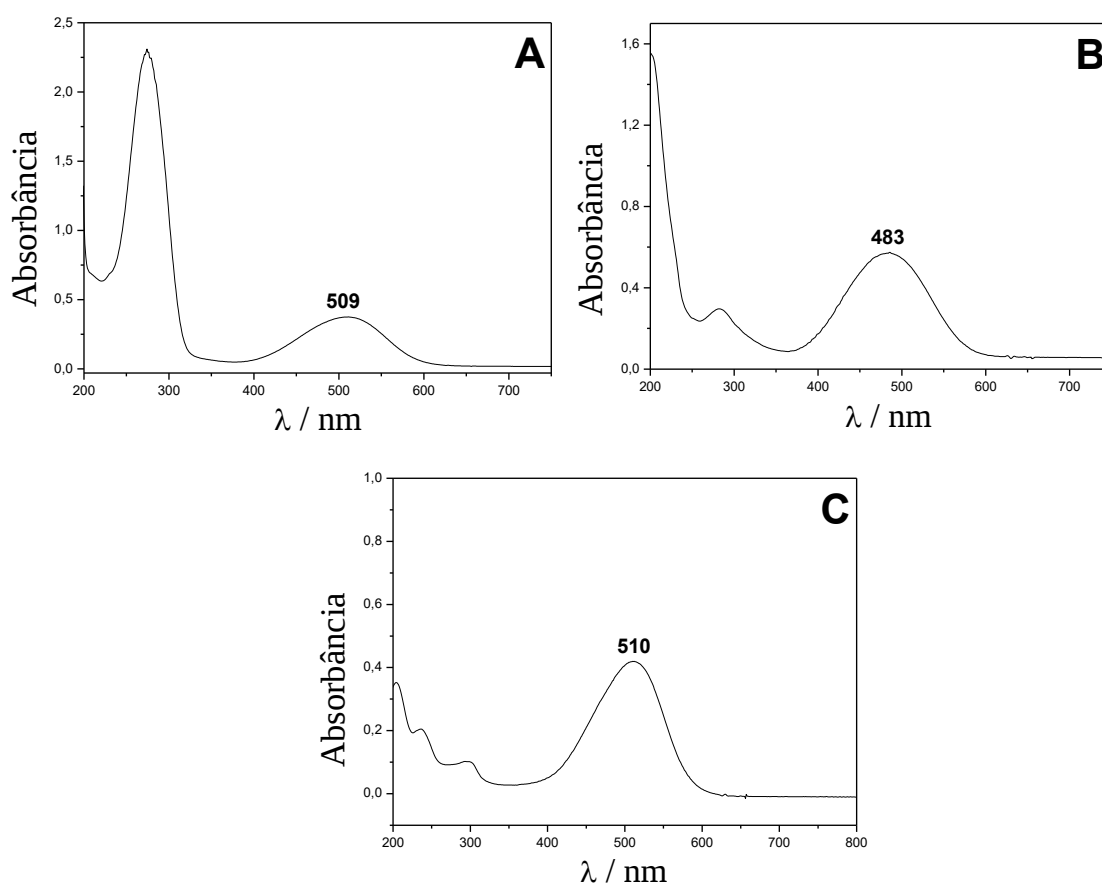
A degradação fotoeletrocatalítica do DR 73 foi realizada após liberação do corante do MMIP e MNIP. Amostras de água enriquecidas com $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do corante DR 73 foram submetidas a pré-concentração no MMIP e MNIP de acordo com o procedimento da seção 3.7.2. A seguir, o corante foi eluído do MMIP usando metanol/água (1: 1, v/v). O corante liberado do MMIP foi coletado e transferido para um reator fotoeletrocatalítico de 100 mL a uma temperatura controlada de 20 °C por um banho termostático. O fotoeletrodo de TiO₂NTs foi irradiado por uma lâmpada de vapor de Hg em alta pressão de 125 W (sem o bulbo) introduzido verticalmente num tubo de quartzo central. O reator consistia de uma célula de dois eletrodos, em que uma placa DSA® foi utilizada como cátodo e o eletrodo de TiO₂NTs como ânodo. O eletrólito utilizado foi Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ e todas as medidas fotoeletroquímicas foram realizadas usando potencial constante de 2,5 V. Alíquotas foram retiradas em tempos controlados e a descoloração foi monitorizada por espectrometria de massa (LC-MS/MS). (80)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características analíticas dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila.

A Figura 8 apresenta os respectivos espectros na região do UV-Vis obtidos para $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila.

Figura 8 - Espectros de absorção na região do UV-Vis na concentração de $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ dos corantes: Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em dissolução com acetonitrila.



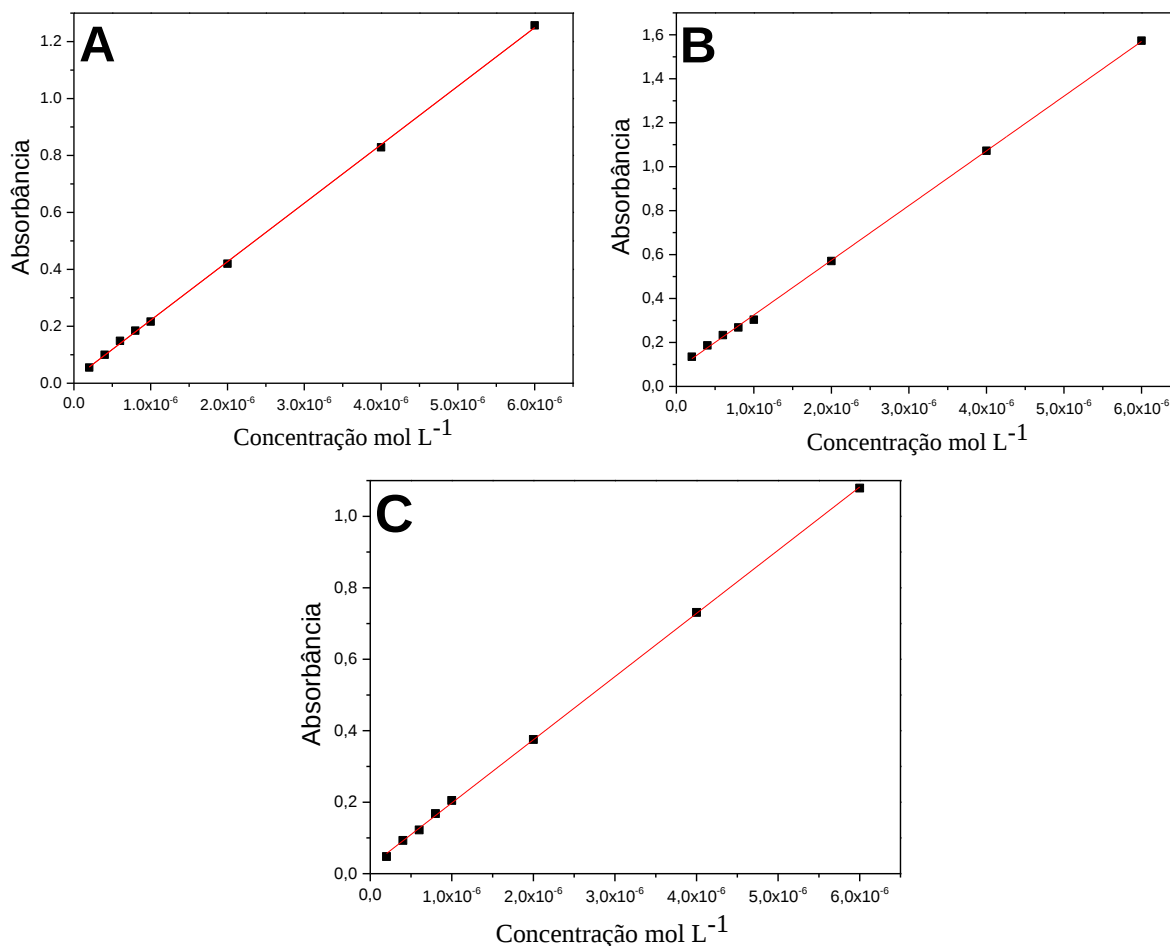
Fonte: autor do trabalho.

A análise desses espectros indica que os corantes analisados apresentam grupos cromóforos, com absorbância máxima nos respectivos comprimentos de onda de: DR 73 ($\lambda = 509 \text{ nm}$), DR 78 ($\lambda = 483 \text{ nm}$) e DR 167 ($\lambda = 510 \text{ nm}$), respectivamente.

Estes comprimentos de onda foram utilizados para construir curvas analíticas para cada corante, conforme ilustradas na Figura 9. Testou-se no intervalo de concentração entre

$2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se os picos de máxima absorbância para os corantes, DR 73 ($\lambda = 509 \text{ nm}$), DR 78 ($\lambda = 483 \text{ nm}$) e DR 167 ($\lambda = 510 \text{ nm}$). Uma relação linear da absorbância e concentração do corante entre $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida, indicando comportamento que segue a lei de Lambert-Beer.

Figura 9 - Curvas analíticas obtidas para os corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila.



Fonte: autor do trabalho.

Os respectivos limites de detecção e quantificação foram determinados pelas equações $\text{LD} = \bar{x}_b + 3 \text{ sb}$ onde: $\bar{x}_b$ = valor médio do branco para o conjunto de dados, sb = desvio padrão do branco para o conjunto de dados e $\text{LQ} = \bar{x}_b + 10 \text{ sb}$, para o Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 respectivamente. Os respectivos parâmetros analisados linearidade, coeficiente de correlação (r), absortividade molar, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Absorbância vs concentração dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila por espectrofotometria na região do UV-Visível (medidas em triplicata).

Corantes	λ / nm	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r)	Limite de detecção / mol L ⁻¹	Limite de quantificação / mol L ⁻¹
DR 73	509	$y=2,05 \times 10^5 x + 0,016$	0,999	$1,17 \times 10^{-6}$	$3,90 \times 10^{-6}$
DR 78	483	$y=2,49 \times 10^5 x + 0,008$	0,999	$9,63 \times 10^{-7}$	$3,21 \times 10^{-6}$
DR 167	510	$y=1,77 \times 10^5 x + 0,021$	0,999	$1,36 \times 10^{-6}$	$4,52 \times 10^{-6}$

Fonte: autor do trabalho.

De acordo, com os parâmetros analíticos encontrados observa-se que a técnica de espectrofotometria na região do visível poderia ser utilizada para determinação dos corantes em amplo intervalo de concentração e valores não muito baixos de limites de quantificação, tais como 10^{-5} mol L⁻¹. Isto ocorre devido a alta absorvidade molar dos corantes em estudo.

Investigou-se a seguir a possibilidade de usar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, cuja seletividade é melhor, além de inúmeras vantagens como alta resolução, versatilidade e bons resultados quantitativos. A técnica oferece a vantagem de separação dos analitos, o que não ocorre por espectrofotometria UV-Vis, além disso, pode ser associada ao detector de arranjo de diodos (DAD) que permite a obtenção dos espectros dos analitos de interesse eluídos em diferentes tempos de retenção. Assim, é possível distinguir espécies que eluem em um mesmo tempo de retenção e que absorvem em comprimentos de onda distintos. Alguns estudos empregando esta técnica em fase-reversa foram reportados para corantes azo.

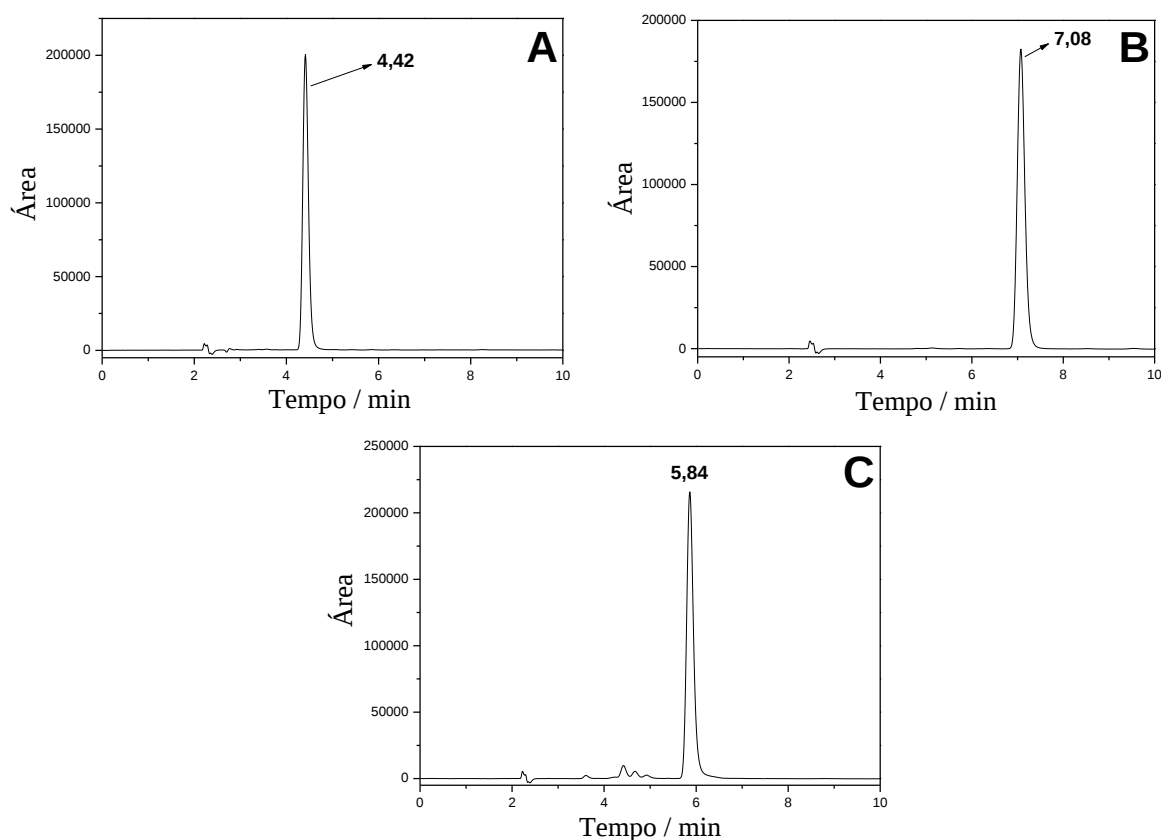
4.2 Análise dos corantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As melhores condições cromatográficas para identificação dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 foram investigados usando amostras individuais dos mesmos em CLAE/DAD.

Para isto, estudou-se inicialmente a fase móvel acetonitrila/H₂O, no modo isocrático e temperatura da coluna de 30 °C. Diferentes parâmetros foram testados tais como: composição da fase móvel, seletividade, vazão entre outros. Foram testadas diferentes proporções de fase

móvel com o intuito de melhorar a resolução dos picos e diminuir o tempo da corrida cromatográfica. A fase móvel que apresentou os melhores resultados para a otimização dos corantes foi: 80:20 ACN/H₂O. O mesmo estudo foi realizado com a vazão e o valor que apresentou os melhores resultados foi 1,0 mL min⁻¹. A Figura 10 ilustra os cromatogramas referentes a otimização dos corantes padrões.

Figura 10 - Cromatograma CLAE-DAD obtido para $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ dos corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em meio acetonitrila obtidos em coluna C18, fase móvel 80:20 ACN/H₂O. vazão = 1,0 mL min⁻¹. T= 30 °C. Detecção: λ = 509 nm; 483 nm e 510 nm correspondentes à: Disperse red 73, Disperse red 78 e Disperse red 167, respectivamente.

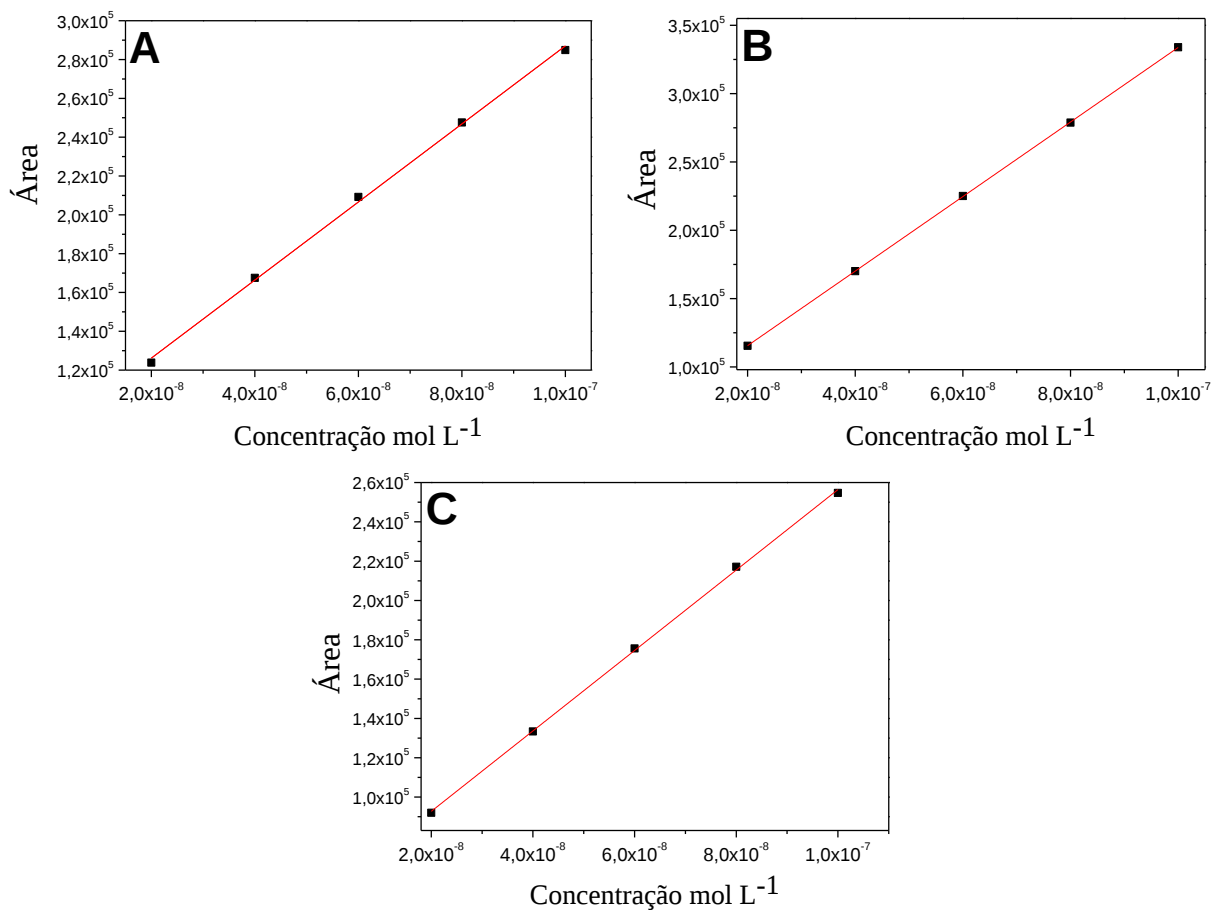


Fonte: autor do trabalho.

O cromatograma registrado para os corantes padrões apresentou três picos bem definidos nos seguintes tempos de retenção: $t_r = 4,42$ min; $t_r = 7,08$ min e $t_r = 5,84$, que correspondem, respectivamente, aos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167. Estes resultados sugerem que a otimização da fase móvel promove uma excelente separação e resolução dos padrões dos corantes com picos sem encaudamento.

A Figura 11 mostra as respectivas curvas analíticas obtidas no CLAE/DAD referente ao padrão dos três corantes. Uma relação linear entre Área e Concentração do corante é obtida, sugerindo que o corante poderia ser analisado por CLAE-DAD.

Figura 11 - Curvas analíticas obtidas para os corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila.



Fonte: autor do trabalho.

Os respectivos limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos das curvas analíticas de Área vs concentração para os corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 em acetonitrila (medidas em triplicata).

Corantes	T _r (min)	λ/nm	Equação da reta	Coefficiente de correlação	Limite de detecção/ mol L ⁻¹	Limite de quantificação /mol L ⁻¹
DR 73	4,42	509	$y = 2,01 \times 10^{12} x + 8,61 \times 10^4$	0,998	$3,89 \times 10^{-9}$	$1,30 \times 10^{-8}$
DR 78	7,08	483	$y = 2,73 \times 10^{12} x - 6,01 \times 10^4$	0,999	$4,02 \times 10^{-10}$	$1,34 \times 10^{-9}$
DR 167	5,84	510	$y = 2,05 \times 10^{12} x + 5,18 \times 10^4$	0,999	$2,40 \times 10^{-9}$	$8,03 \times 10^{-9}$

Fonte: autor do trabalho.

As curvas analíticas dos corantes apresentaram coeficientes de correlação próximos à 1. Os valores de LQ e LD, obtidos pela equação de reta gerada pela curva analítica, apresentam valores na ordem de 10^{-8} a 10^{-10} mol L⁻¹, comprovando que a técnica de CLAE-DAD possui maior sensibilidade na detecção e quantificação de analitos em relação a técnica espectrofotométrica, que apresentou valores na ordem de 10^{-6} mol L⁻¹.

4.3 Teste de Ames com corantes do tipo azo DR 73, DR 78 e DR 167.

Primeiramente, testou-se os resultados sobre a atividade mutagênica dos corantes. Este trabalho foi realizado no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas em parceria com a Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, as medidas foram realizadas pela doutoranda Gabriela Meireles.

A Tabela 5 ilustra os resultados obtidos para o teste de mutação genética reversa conduzida em DR 73, DR 78 e DR 167 usando linhagens de *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) TA 98 e TA 100, que são produtoras das enzimas azoredutase e nitroredutase.

De acordo com os resultados obtidos, o corante Disperse Red 73 é o composto mais mutagênico (Tabela 5). A linhagem TA 98, na ausência de metabolização (-S9), apresentou mutagenicidade positiva, porém, esta diminuiu na presença de ativação metabólica, mostrando que, provavelmente, enzimas presentes no fígado de rato promovem a mudança de determinados grupos funcionais e torna o corante menos mutagênico. Na linhagem TA 100, o DR 73 também induziu um aumento no número de colônias revertentes em relação ao controle negativo em experimentos sem ativação metabólica, indicando mutagenicidade direta também nesta linhagem. Portanto, o corante DR 73 induz substituição de pares de bases (TA 100) e também mutações do tipo *frameshift* (TA 98), revelando a presença de compostos mutagênicos tanto de ação direta, os quais induzem mutações antes de serem metabolizados pelo sistema de metabolização exógena (S9), quanto de ação indireta, mesmo que em menor número de revertentes por placa. Através dos resultados apresentados, comprova-se que o corante necessita ser ativado para que seus metabólitos induzam algum tipo de mutação. Com base em Claxton *et al.* (93), Disperse Red 73 é classificado como mutagênico moderado (10 - 100 µg⁻¹). Os outros dois corantes analisados possuem baixo potencial mutagênico, considerando-se as respostas para TA 98 e TA 100, tanto na presença, quanto na ausência da mistura S9.

Tabela 5 - Atividade mutagênica dos corantes DR 73, DR 78 e DR 167 nas linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*, em ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Potencial mutagênico (revertentes/ μg)	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Disperse Red 73	29,9	5,0	34,4	1,0
Disperse Red 78	0,2	0,4	-	-
Disperse Red 167	0,3	0,5	-	-

Controle negativo: dimetilsulfóxido, 75 μl / placa.

Controles positivos: óxido de 4 nitroquinolina (0,05+A27)(TA 98 e TA 100) na presença de S9. ^b: 2 aminoantraceno (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (TA98 e TA100) na ausência de S9.

Fonte: autor do trabalho.

Os resultados obtidos para o corante Disperse Red 78 (Tabela 5) mostrou mutagenicidade negativa para a linhagem TA 100 e resposta positiva para a linhagem TA 98 na presença e na ausência de ativação metabólica (S9). Os sinais de toxicidade foram observados na linhagem TA 98 somente quando utilizou-se concentração de corante acima de 50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Assim, conclui-se que o corante DR 78 é capaz de induzir uma mutação do tipo frameshift.

A Tabela 5 ilustra que o corante Disperse Red 167 só mostrou evidência de mutagenicidade na linhagem TA 98, na ausência e na presença de metabolização, indicando a presença de compostos indutores de mutações frameshift. No entanto, esta mutagenicidade só foi confirmada na concentração de amostra acima de 50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, assim como os resultados apresentados pelo corante DR 78.

A análise dos resultados demonstraram que DR 73, DR 78 e DR 167 induziram maior atividade mutagênica ao utilizar a linhagem TA 98 em comparação com a TA 100. A exceção foi o DR 73, que mostrou valores semelhantes para as duas linhagens. Estes dados sugerem que a ação da enzima azoredutase, normalmente produzida em grande quantidade pela linhagem TA 98, parece desempenhar um papel importante na mutagenicidade. O sistema de metabolização S9 diminuiu a mutagenicidade do DR 73, possivelmente porque os produtos gerados após o metabolismo do DR 73 via citocromo P-450 possuíam menor potencial

mutagênico em relação ao corante original. Os corantes DR 78 e DR 167 apresentaram baixa atividade mutagênica, tanto na ausência e presença de atividade metabólica (P-450). (94)

DR 73 apresentou valores muito mais elevados de revertentes por placa em comparação com DR 78 e DR 167. O corante Disperse Red 73 contém uma nitrila na sua estrutura, enquanto que o DR 78 carrega o cloro como um dos substituintes do anel aromático e DR 167 contém cloro e um grupo volumoso de amina dissustituída ($C_2H_4OCOCH_3$). Os substituintes em DR 78 e DR 167, provavelmente diminuem a densidade de elétrons no grupo azo, consequentemente, diminuindo a sua mutagenicidade em comparação com o DR 73. (95)

Com base nos resultados descritos acima, apesar de ser um teste bacteriano, o teste de *Salmonella*/microsoma poderia ser uma ferramenta importante para prever como a ingestão de corantes dispersos do tipo azo afetam a saúde humana. *Salmonella* é uma enterobactéria cujas características metabólicas assemelham-se às características da flora intestinal de mamíferos. Portanto, pode-se produzir as enzimas azoreductase e nitroreductase com o objetivo principal de detectar mutações do tipo frameshift e substituição de pares de bases de DNA. (37)

Desta forma, o intestino delgado é um possível órgão alvo de carcinogênese pela exposição a corante azo. (62) Investigou-se a seguir, os possíveis metabólitos formados através de reações com enzimas do tipo redutoras (azoreductase e nitroreductase) e microsoma de fígado de rato pré-tratado (fração S9), por LC-MS/MS, simulando o que ocorre no organismo, microflora intestinal e citoplasma, após ingestão desses corantes com o intuito de correlacionar estrutura química à atividade mutagênica dos corantes.

4.4 Biotransformação *in vitro* dos corantes têxteis DR 73, DR 78 e DR 167 utilizando microsoma de fígado de rato

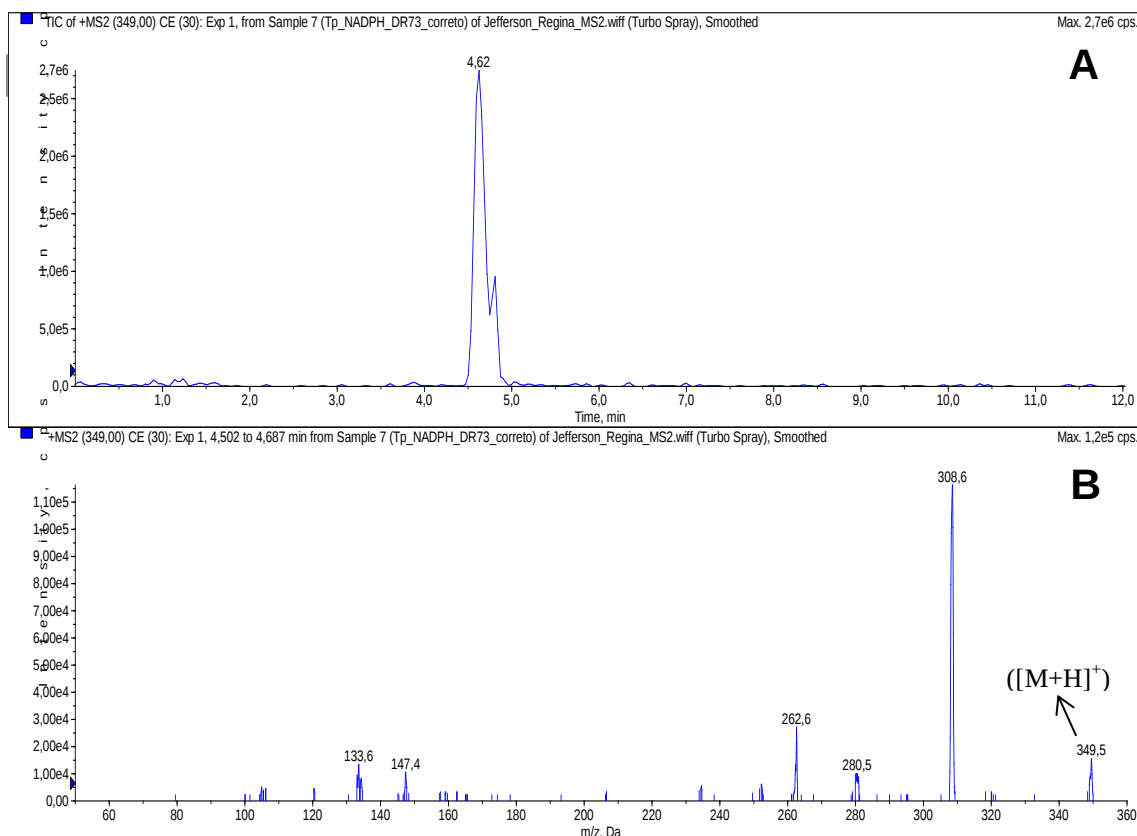
Para avaliar o perfil metabólico de um corante ou outra droga xenobiótica no nosso organismo, microsomas hepáticos são provavelmente os mais utilizados no sistema *in vitro* (96), pois contém a superfamília de enzimas do complexo citocromo P-450 (97) e este sistema foi selecionado para este trabalho. Para a detecção e a separação de metabólitos, a maior parte do trabalho foi feita utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), devido à sua seletividade, a sensibilidade e velocidade de análise (98). A identificação e análise estrutural foram realizadas sobre o uso também de LC-MS, utilizando experimentos de íon fragmento (MS/MS).

O método de LC-MS foi desenvolvido para ser utilizado para perfis de metabólitos desconhecidos obtidos a partir da biotransformação microsomal dos corantes têxteis Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167. Inicialmente, o método de LC-MS/MS foi utilizado para detectar qualquer metabolito através da aquisição de dados, utilizando MS verificação completa entre m/z 200 a m/z 800. Para identificar o possível metabólito, realizou a comparação dos cromatogramas de íons totais e espectros de massa obtidos para as amostras de controle (ausência de microsossoma de rato) com as amostras de biotransformação. Sendo assim, foram consideradas como potenciais metabólitos os íons que não estavam presentes na amostra controle.

Planejamento fatorial foi utilizado como uma ferramenta para a otimização dos parâmetros de biotransformação. A partir dos resultados obtidos, observou-se que a maior produção de potenciais metabólitos para o metabolismo *in vitro* dos corantes ocorreu quando se utilizaram maior tempo de biotransformação e concentração de enzima mais elevada. Portanto, as condições experimentais ótimas para o metabolismo *in vitro* de corantes têxteis foram: 10 μL de corante têxtil ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 50 μL de microsossomas de fígado de rato (50 mg mL^{-1}), 10 μL de NADPH (5 mmol L^{-1}) e 430 μL de tampão de fosfato de potássio (100 mmol L^{-1} , pH 7,0) e 120 minutos para o tempo de reação.

Ao comparar o *full scan* MS da amostra de controle e as que continham microsossomas de fígado de rato, as amostras DR 73 e DR 167 apresentaram área de depleção de 100% da concentração inicial, enquanto que para o substrato DR 78, observou-se uma área de depleção de 69%. O perfil cromatográfico obtido por LC-MS/MS para os corantes padrão DR 73, DR 78 e DR 167, no modo positivo, revelou a eluição do corante DR 73 a 4,62 min, m/z 349, que corresponde à molécula protonada, $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Figura 12A) e a fragmentação do seu padrão (Figura 12B). O corante DR 78 foi detectado em 6,76 min, m/z 359 ($[\text{M} + \text{H}]^+$) (Figura 13A, a fragmentação do padrão 13B) e o corante DR 167 revelou seu pico cromatográfico em 6,20 min, m/z 506 ($[\text{M} + \text{H}]^+$) (Figura 14A, 14B fragmentação do padrão).

Figura 12 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) do corante padrão Disperse Red 73, tampão de fosfato e NADPH e **B)** Espectro de massas MS/MS do corante padrão Disperse Red 73 protonado.



Fonte: autor do trabalho.

Figura 13 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) do corante padrão Disperse Red 78, tampão de fosfato e NADPH e **B)** Espectro de massas MS/MS do corante padrão Disperse Red 78 protonado.

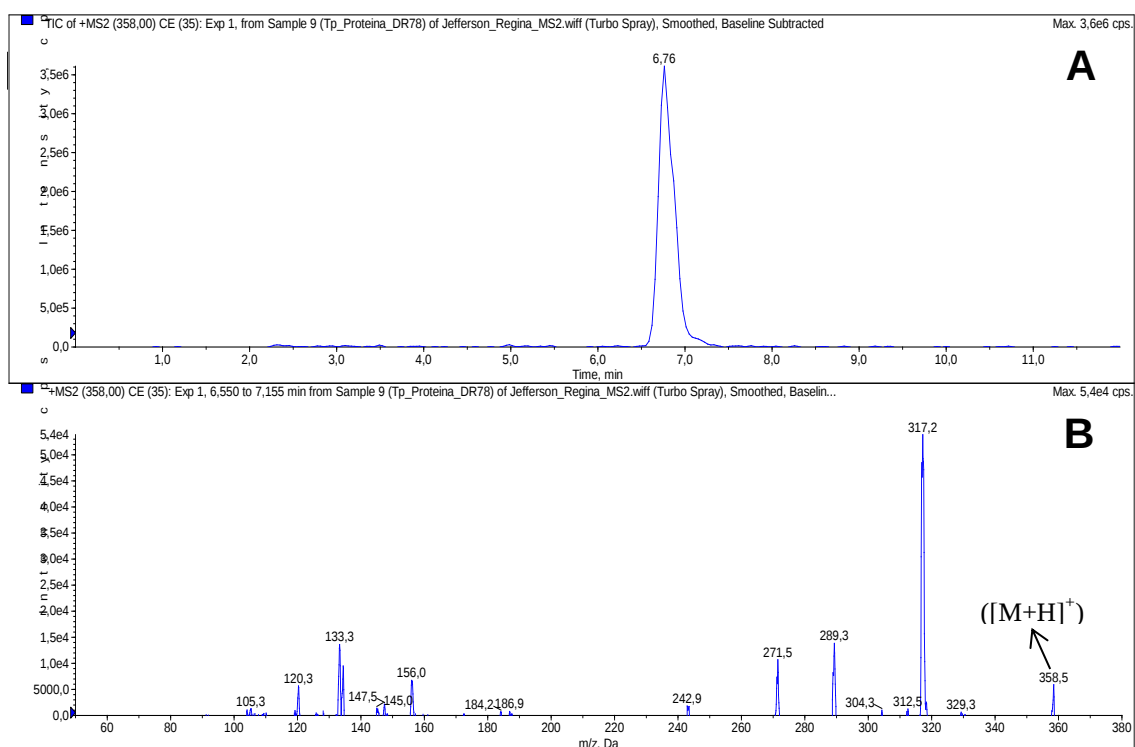
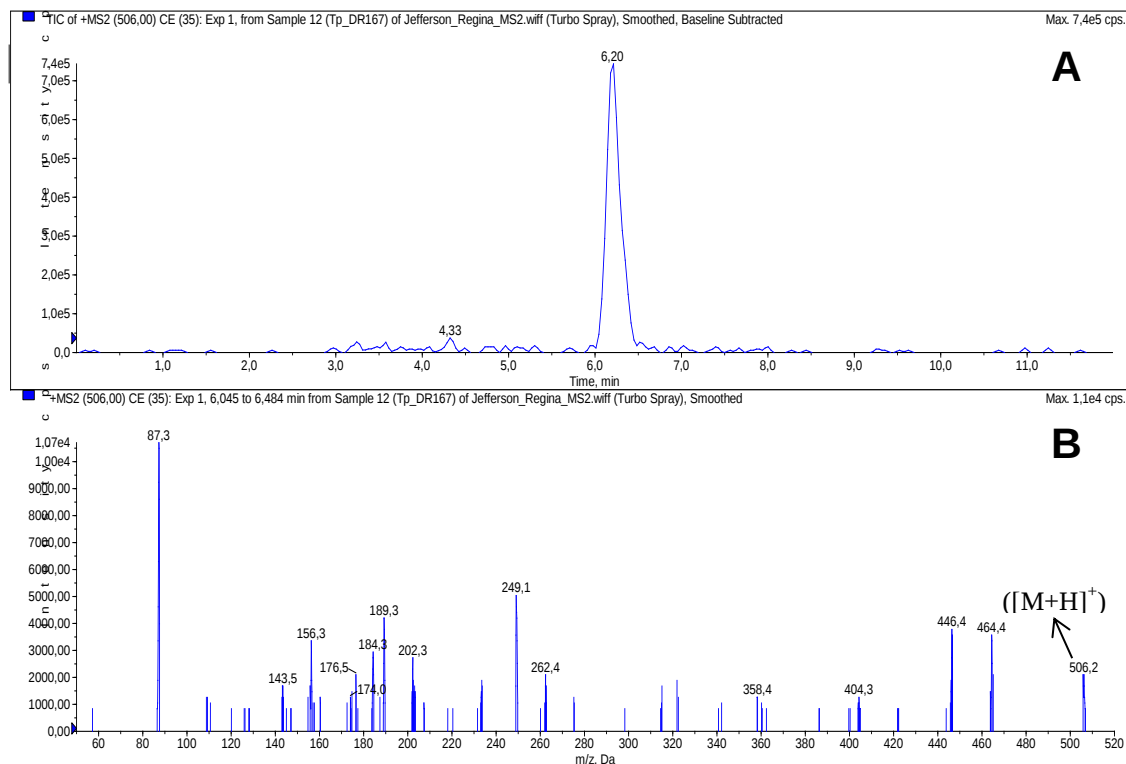


Figura 14 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) do corante padrão Disperse Red 167, tampão de fosfato e NADPH e B) Espectro de massas MS/MS do corante padrão Disperse Red 167 protonado.

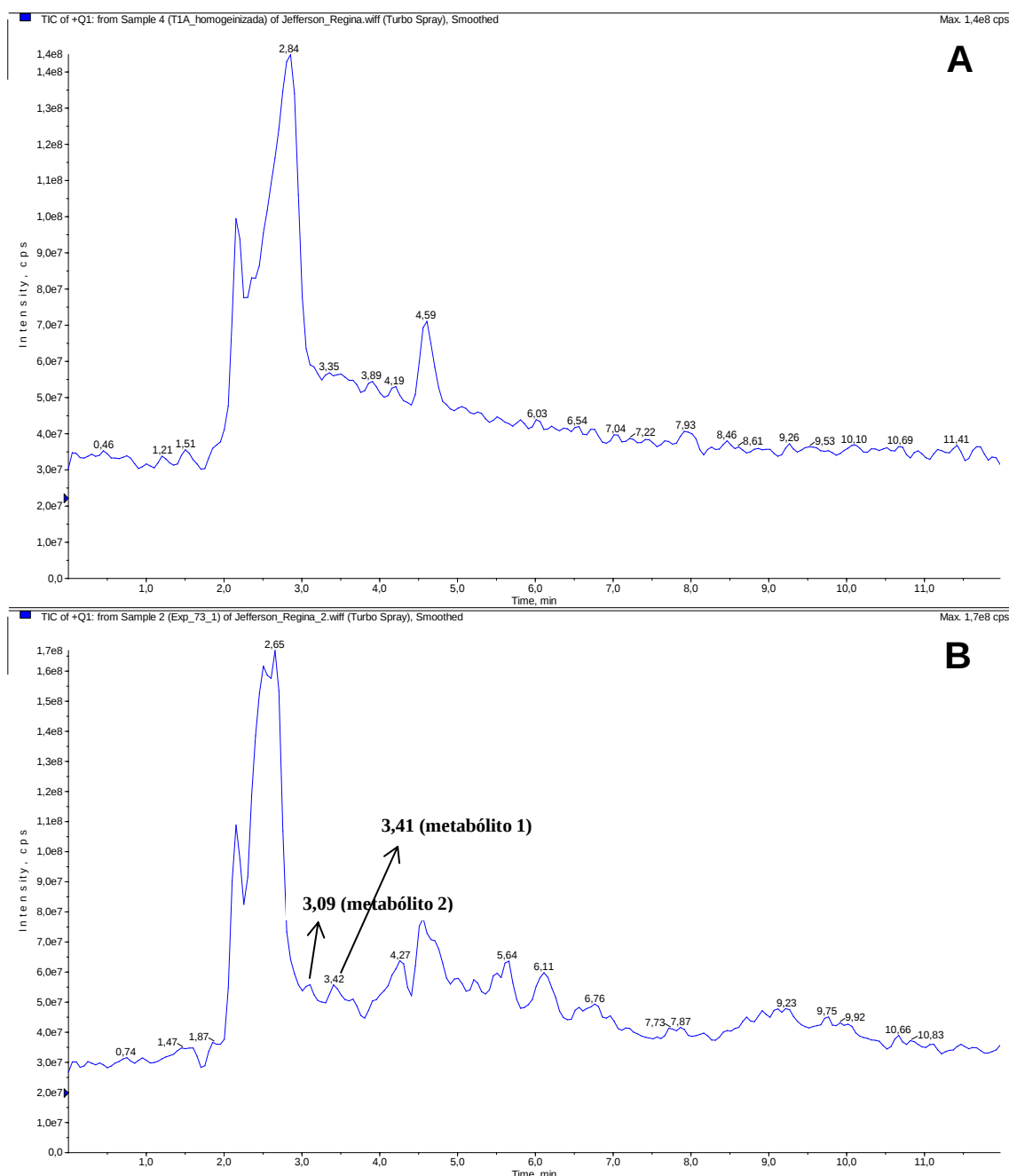


Fonte: autor do trabalho.

4.4.1 Corante Disperse Red 73

A Figura 15 apresentou o perfil cromatográfico (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 73 antes da reação com microsossomas hepáticos, Figura 15A, e após a reação com microsossomas hepáticos, Figura 15B.

Figura 15 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 73 antes da reação com microssoma e B) após reação com microssoma; picos cromatográficos com $t_r = 3,41$ min (metabólito 1) e $t_r = 3,09$ min (metabólito 2).



Fonte: autor do trabalho.

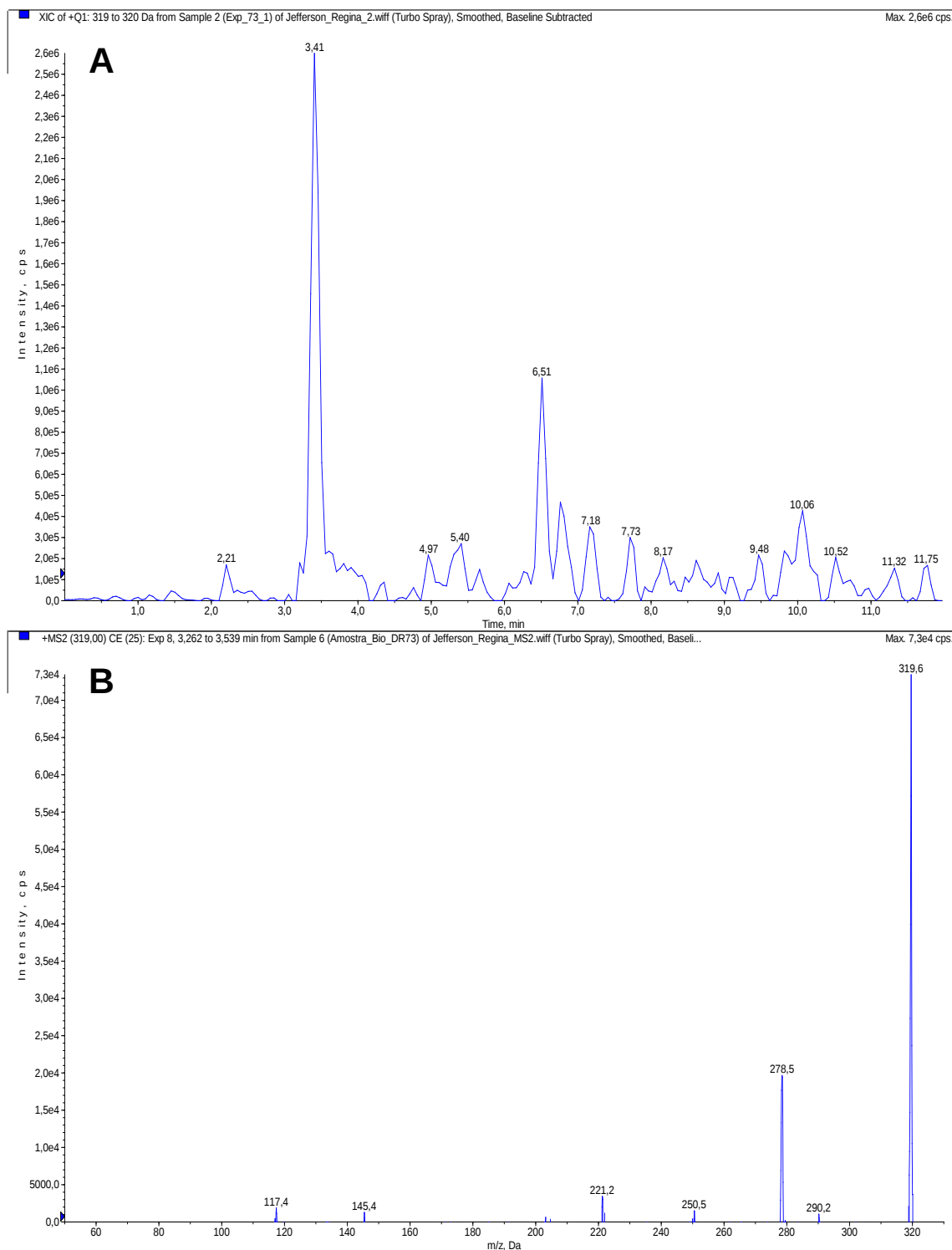
Através da comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras de controle e de biotransformação, pode-se observar dois picos intensos em 2,65 min e 2,84 min, o que corresponde a interferentes presentes no meio. Na amostra controle, Figura 15A, o corante DR 73 foi detectado em 4,59 min (m/z 349), mas este substrato estava ausente na amostra de biotransformação, confirmando a sua biodegradação completa. Um pico identificado a 4,55 min na amostra de biotransformação poderia ser do corante padrão DR 73, porém essa hipótese foi excluída ao confirmar pelo espectro de massas, que não se tratava do mesmo.

Como o cromatograma de íons totais abrange uma larga gama de massa e mostra um background elevado, o qual compromete a detecção visual de novos picos no cromatograma, sendo assim, aplicou-se a subtração do background para análises de todas as amostras.

Um potencial metabólito (1) com m/z 319 ($[M + H]^+$) foi observado em 3,41 minutos, Figura 17. Confirmou-se o produto de m/z 319 pela análise do cromatograma de íons extraídos (XIC) e de fragmentos de (EPI), Figura 16 A-B.

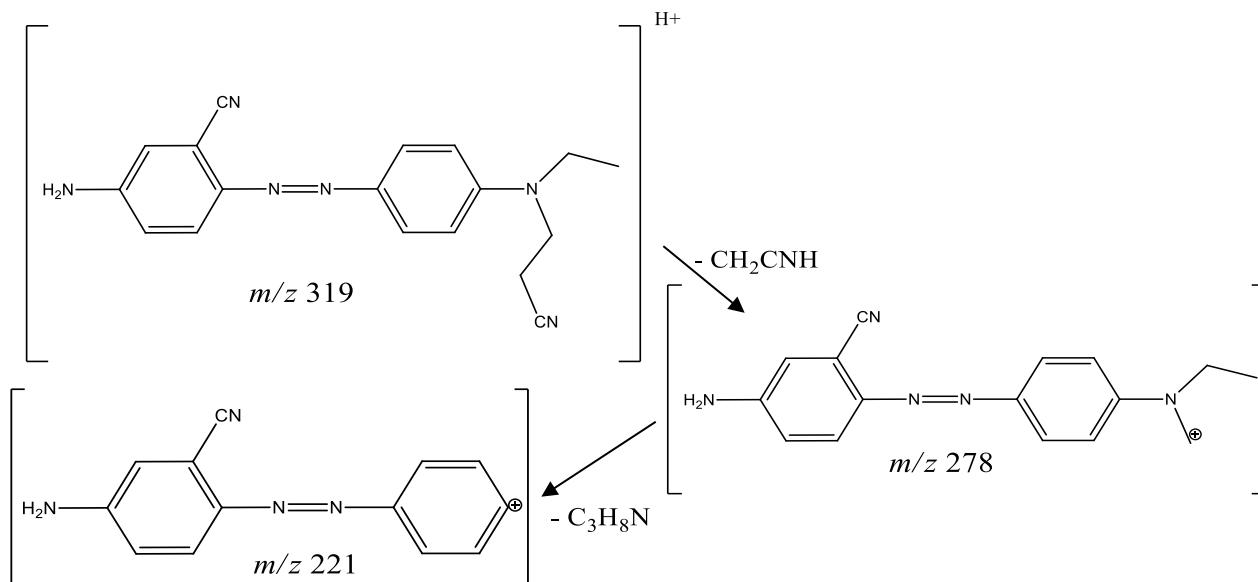
O espectro de massas (Fig. 16B) revelou como íon fragmento mais intenso m/z 278, como o pico base, que corresponde à perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 221, indicando a perda da amina dissubstituída, a qual estava ligada ao anel aromático. Portanto, este novo metabólito (1) foi atribuído à 2-(2-(4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)hidrazinil)-5-nitrobenzonitrila como o produto principal após a biotransformação do corante DR 73. Uma proposta de fragmentação foi descrita para os experimentos de LC-MS/MS, como mostra a Figura 17.

Figura 16 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 319 ($[M + H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 319.



Fonte: autor do trabalho.

Figura 17 - Fragmentação proposta para o metabólito (1) m/z 319, formado após a incubação de 5 mg L^{-1} do corante padrão DR 73 com microsossoma de fígado de rato.



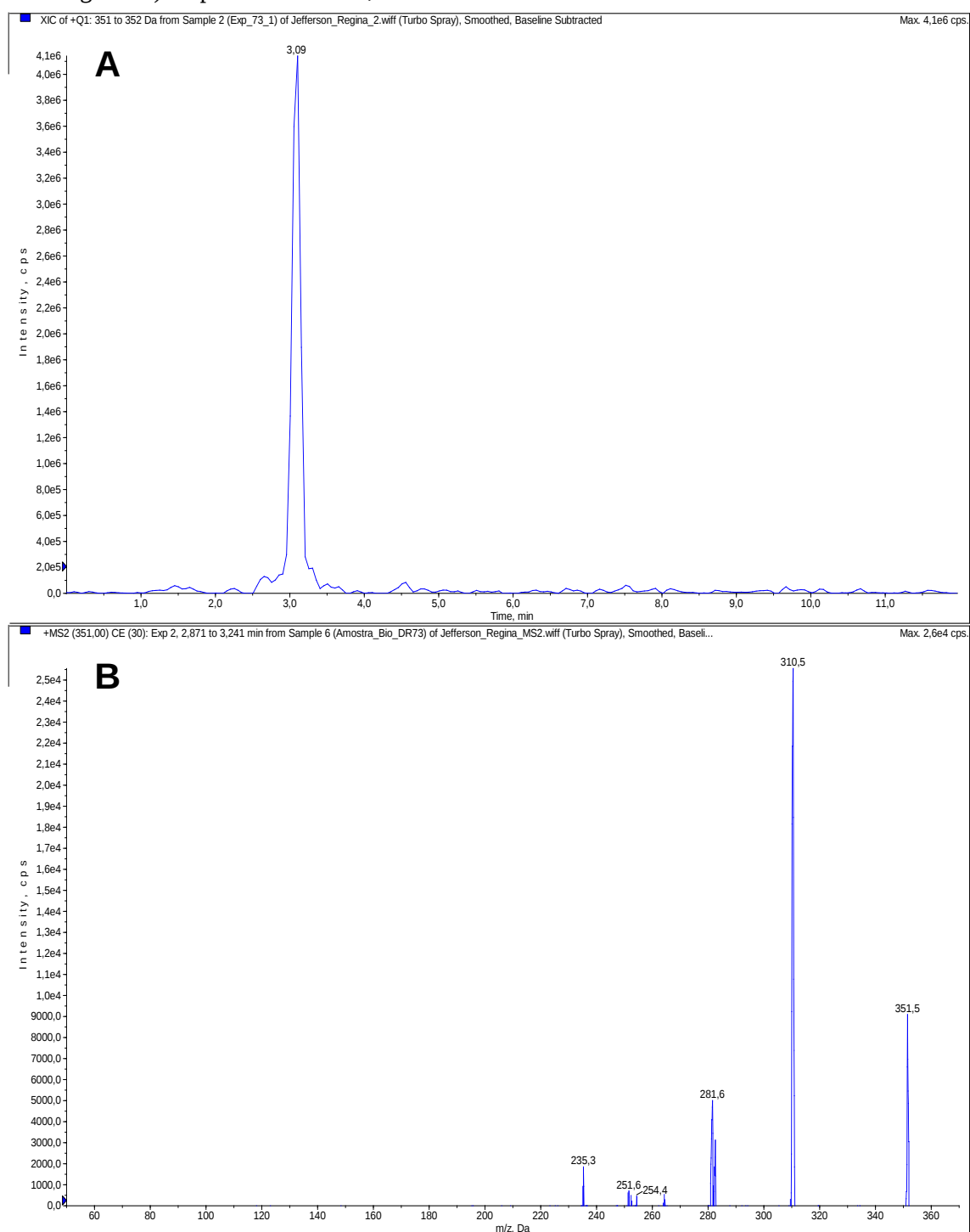
Fonte: autor do trabalho.

Estes resultados mostram que o corante DR 73 é metabolizado por enzimas CYP P-450 do microsossoma de fígado de rato e a produção de um metabólito principal de m/z 319, que ocorre através da redução do grupo nitro do corante.

Além do metabólito (1), um outro pico cromatográfico foi detectado nas amostras de biotransformação do DR 73 (Figura 15B), e observou-se a ausência do mesmo na amostra controle (Figura 15A). Este pico foi detectado em 3,09 min resulta no íon de m/z 351 $[M + H]^+$ como ilustra a Figura 18.

A presença deste potencial metabólito (2) foi confirmada por análise de MS/MS de m/z 351 (Figura 18B).

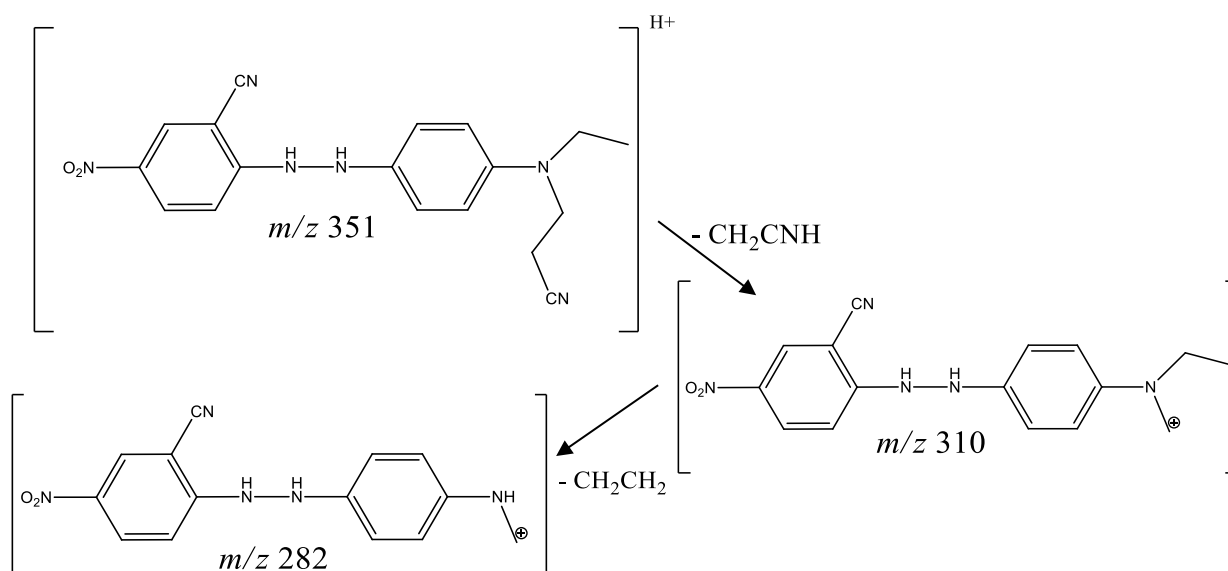
Figura 18 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 351 ($[M + H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 351.



Fonte: autor do trabalho.

O espectro de massa MS/MS mostrou como principal íon fragmento m/z 310, que se relaciona com a perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 282, o qual está relacionado com a perda do grupo etila. Com base no espectro de íon fragmento obtido na Figura 18B, o metabólito (2) foi atribuído à estrutura 5-amino-2-((4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)diazenil)benzonitrila. A diferença de massa de 2 Da indica uma reação que é associada com a redução do grupo azo resultando no grupo hidrazo. A Figura 19 ilustra a proposta fragmentação para este novo metabólito.

Figura 19 - Fragmentação proposta para o metabólito (2) m/z 351, formado após a incubação de 5 mg L⁻¹ do corante padrão DR 73 com microsossoma de fígado de rato.



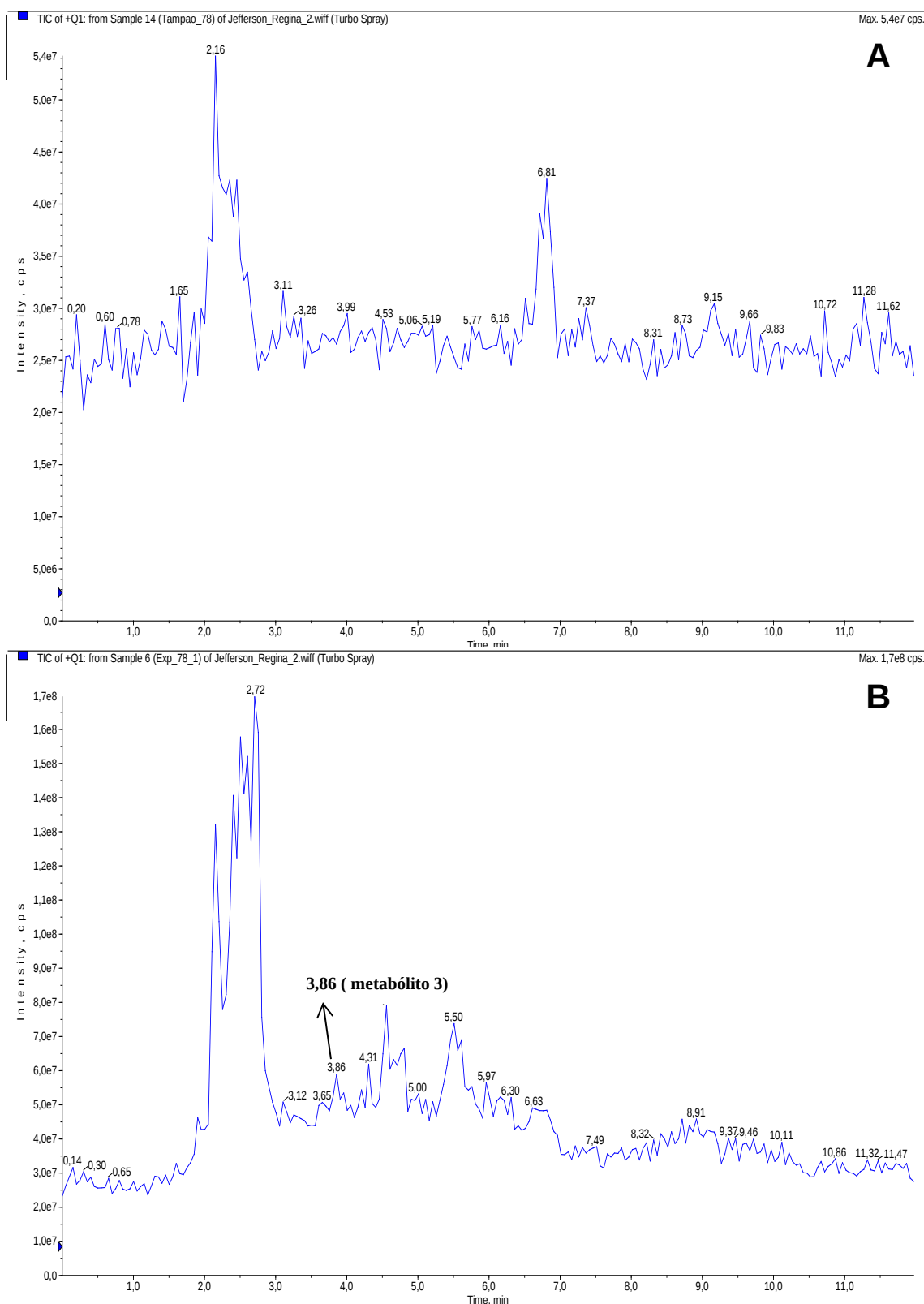
Fonte: autor do trabalho.

Assim, pode concluir-se que a biotransformação *in vitro* do DR 73 produziu dois produtos de biotransformação que foram obtidos por redução do grupo azo e por redução do grupo nitro da molécula do corante, respectivamente.

4.4.2 Corante Disperse Red 78

As investigações sobre os possíveis metabólitos formados para o corante DR 78 foram realizadas. A Figura 20 mostrou o cromatograma de íons totais obtido por LC-MS para o corante DR 78 antes (Figura 20A) e após a reação enzimática (Figura 20B).

Figura 20 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 78 antes da reação com microssoma e B) após reação com microssoma; picos cromatográficos com $t_r = 3,86$ min (metabólito 3).



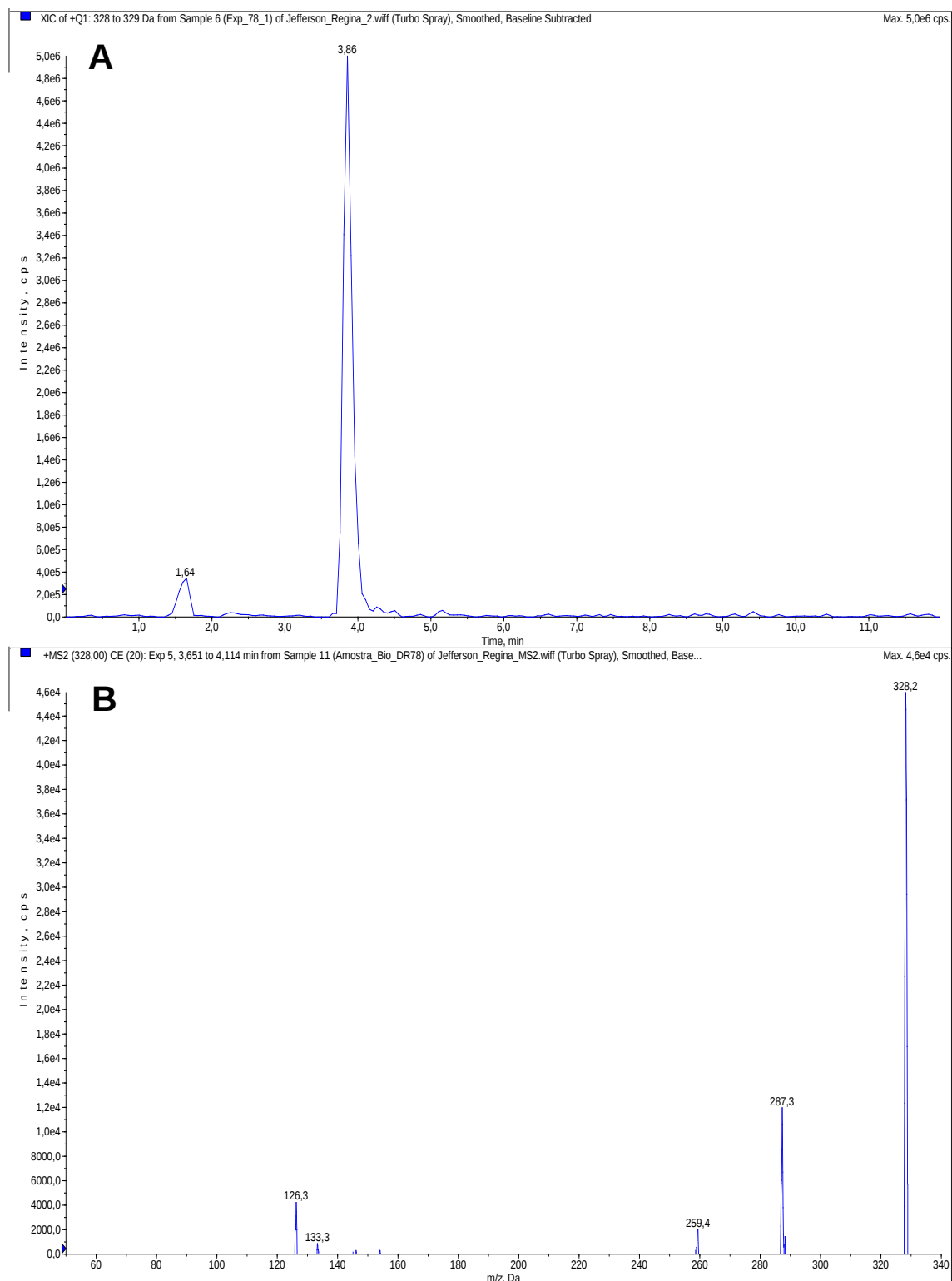
Fonte: autor do trabalho.

Nota-se que os cromatogramas de íons totais mostram picos intensos em baixos tempos de retenção (2,16 min e 2,72 min), que são referentes à reagentes do meio reacional. Embora os outros picos observados na Figura 20B (substrato na presença de microssoma) se assemelhem aos observados na amostra controle (amostra contendo o substrato, mas não microssoma), observou-se uma queda na área do pico cromatográfico do corante padrão DR 78 (pico cromatográfico em 6,8 min), indicando uma possível reação de biotransformação do corante.

Analisando cuidadosamente a amostra de biotransformação, foi possível observar um pico cromatográfico nas amostras de biotransformação do DR 78 (Figura 20B), e observou-se a ausência do mesmo na amostra controle (Figura 20A). Este pico foi detectado em 3,86 min resulta no íon de m/z 328 $[M + H]^+$ como ilustra a Figura 21.

O possível produto foi confirmado pela análise de íons fragmento (EPI) de m/z 328, como mostra a Figura 21B, a qual ilustra o espectro de massa de íons fragmento. O íon fragmento mais intenso m/z 287 (pico base) corresponde à perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 259, indicando a perda de um grupo etila. Além disso, o íon m/z 126 foi também observado e está correlacionado com a clivagem da ligação entre a amina do grupo azo com o anel aromático que contém o cloro e o grupo NH_2 reduzido. A diferença de massa de 30 Da para o íon molecular indica a redução no grupo nitro, ($-NO_2$) a NH_2 . Portanto, este novo metabolito (3) foi atribuído à 3-((4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)(etil)amino)propanenitrila como o produto principal após a biotransformação do corante DR 78.

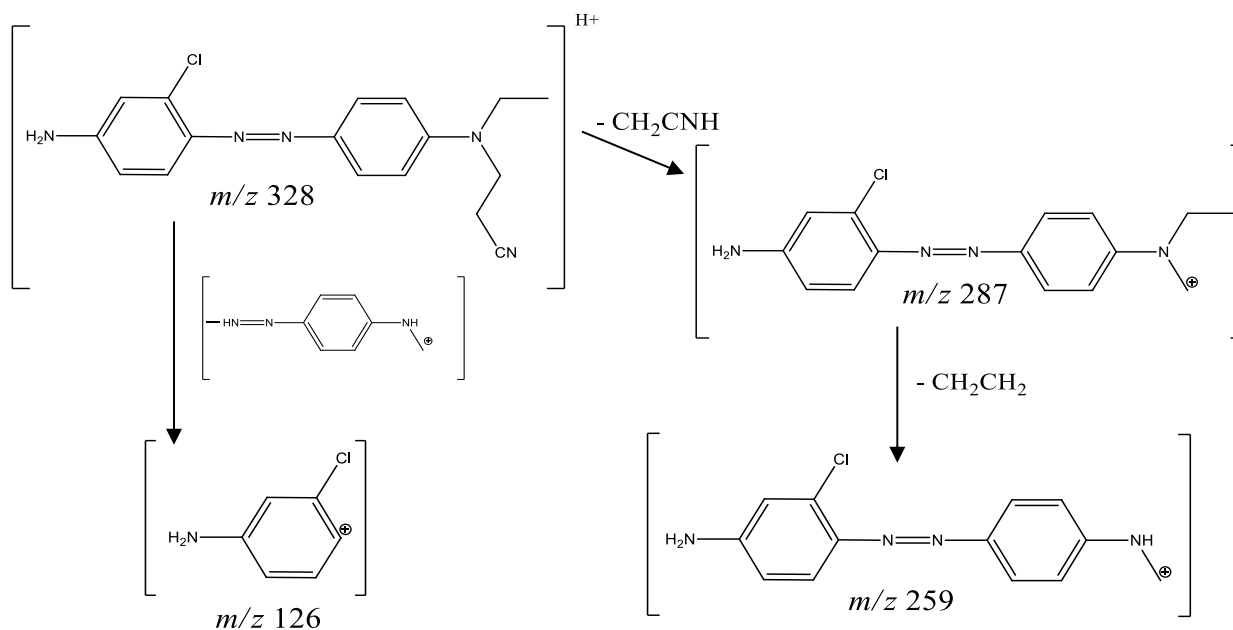
Figura 21 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 328 ($[M + H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 328.



Fonte: autor do trabalho.

A proposta fragmentação para os experimentos de LC-MS/MS é mostrada na Figura 22.

Figura 22 - Fragmentação proposta para o metabólito (3) m/z 328, formado após a incubação de 5 mg L⁻¹ do corante padrão DR 78 com microsoma de fígado de rato.



Fonte: autor do trabalho.

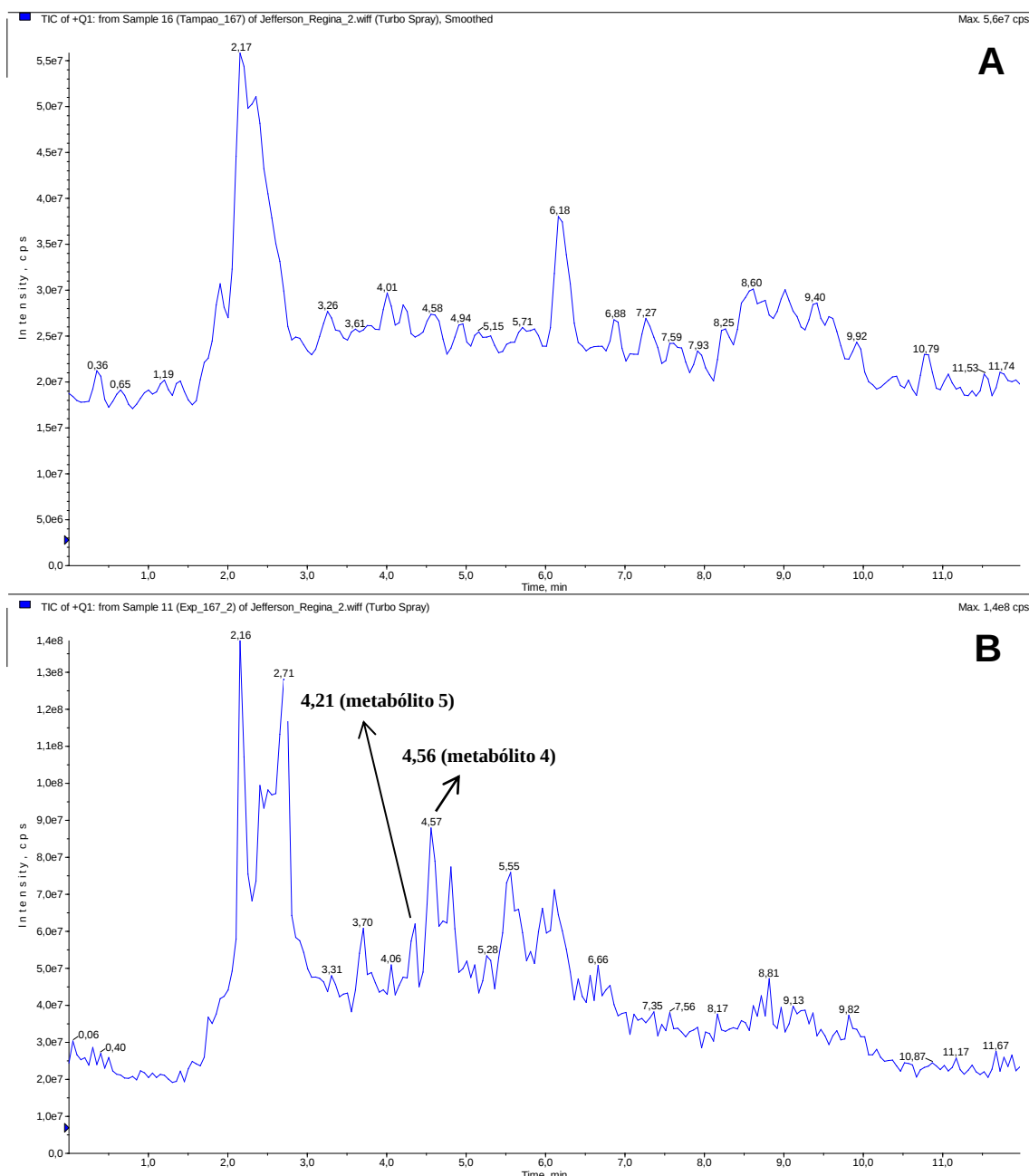
Estes resultados demonstram que o corante DR 78 é metabolizado por enzimas CYP P450 em microsoma de fígado de rato, produzindo um metabólito de m/z 328, através da redução do grupo nitro do corante.

O metabólito (3) obtido (m/z 328) para o DR 78, formado pela redução do grupo nitro, apresentou a mesma reação observada para a produção do metabólito (1) para o DR 73, o qual apresentou o produto de m/z 319. No entanto, embora os corantes DR 73 e DR 78 possuam estruturas químicas semelhantes, o metabolismo do corante DR 78 não produziu um metabólito pela redução do grupo azo, tal como foi observado para o corante DR 73.

4.4.3 Corante Disperse Red 167

A Figura 23 (A,B) mostra o cromatograma de íons totais obtido por LC-MS para o corante DR 167 antes e após a reação enzimática.

Figura 23 - A) Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 167 antes da reação com microssoma e B) após reação com microssoma; picos cromatográficos com $t_r = 4,56$ min (metabólito 4) e $t_r = 4,21$ min (metabólito 5).

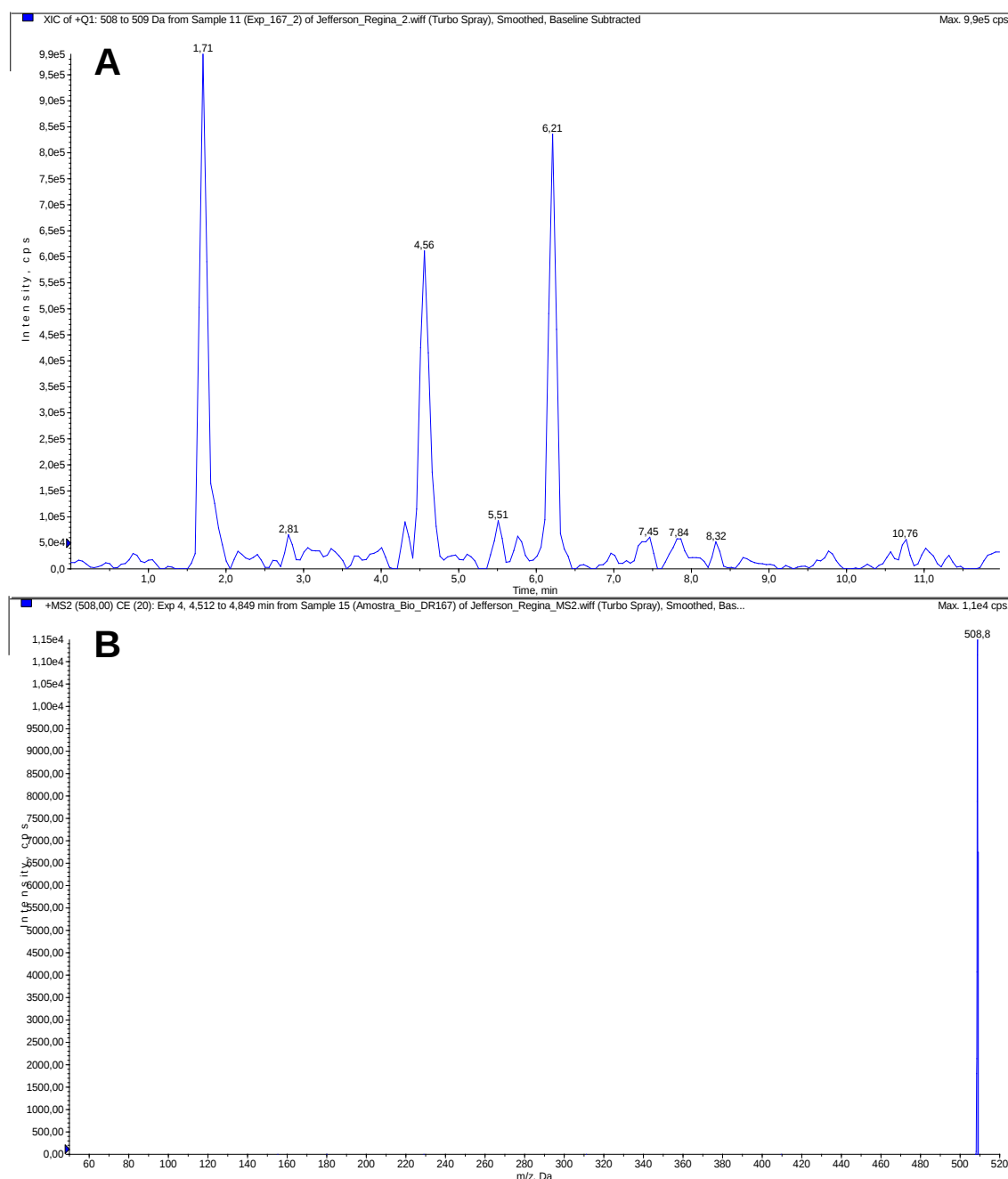


Fonte: autor do trabalho.

Na Figura 23A, o corante DR 167 é detectado como m/z 506 ($[M + H]^+$) com tempo de retenção de 6,18 min, o qual não foi detectado na amostra de biotransformação (Figura

23B). Ao analisar o cromatograma de íons totais obtido antes e após a reação enzimática, detectou-se um pico cromatográfico a 4,56 min, m/z 508 ($[M + H]^+$), indicando provavelmente a formação de um novo metabólito como ilustra a Figura 24.

Figura 24 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 508 ($[M + H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 508.



Fonte: autor do trabalho.

A presença deste possível metabólito foi confirmada pela análise do cromatograma de íon extraído (XIC) e análise de íons fragmento (EPI) de m/z 508 como ilustra a Figura 24(A,B).

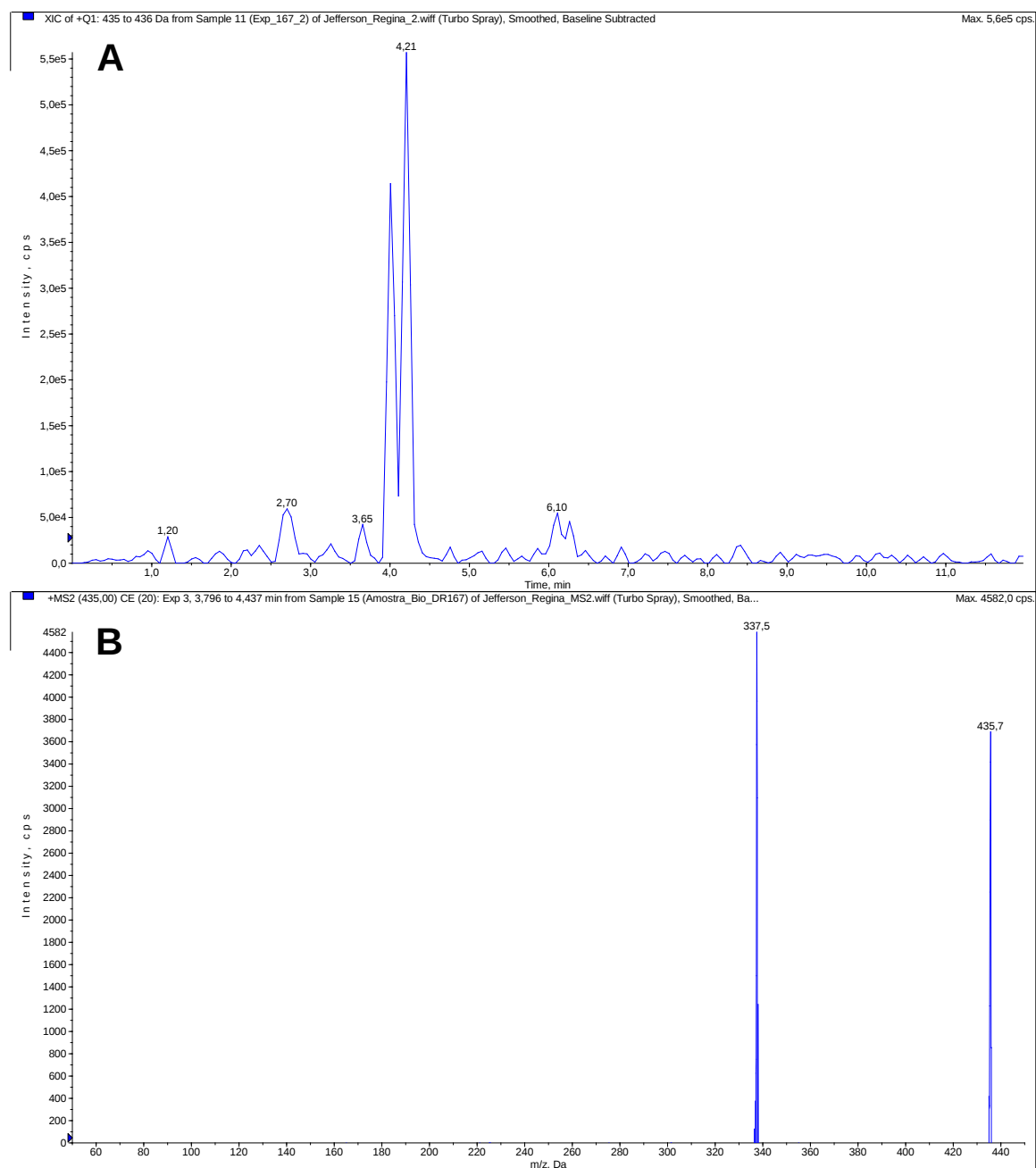
Para propor a estrutura química do produto detectado, utilizou-se a análise de MS/MS de m/z 508 (Figura 24B), contudo, independente das energias utilizadas no experimento, o íon m/z 508 não apresentou íons fragmento, não sendo possível a obtenção de uma rota de fragmentação, mas prova-se que realmente houve a formação do metabólito de m/z 508. A diferença de massa de 2 Da indica que o microsoma atuou no grupo azo, causando a redução desse grupo e formando o grupo hidrazo, NH-NH.

Assim, o íon foi confirmado pelo espectro de íon extraído, uma vez que estava presente na amostra de biotransformação e ausente na amostra controle e foi identificado como dimetil 3,3'-((3-acetamido-4-(2-(2-cloro-4-nitrofenil)hidrazinil)fenil)azanodil)dipropionato (metabólito 4).

Além do metabólito (4), também foi detectado outro pico cromatográfico presente na amostra de biotransformação do corante DR 167 (Figura 23B), este pico foi detectado em 4,21 min e m/z 435 $[M + H]^+$ (Figura 25A) e não foi detectado na amostra controle (Figura 23A). O produto foi confirmado pela análise de íons fragmento (EPI) de m/z 435 como mostra a Figura 25B.

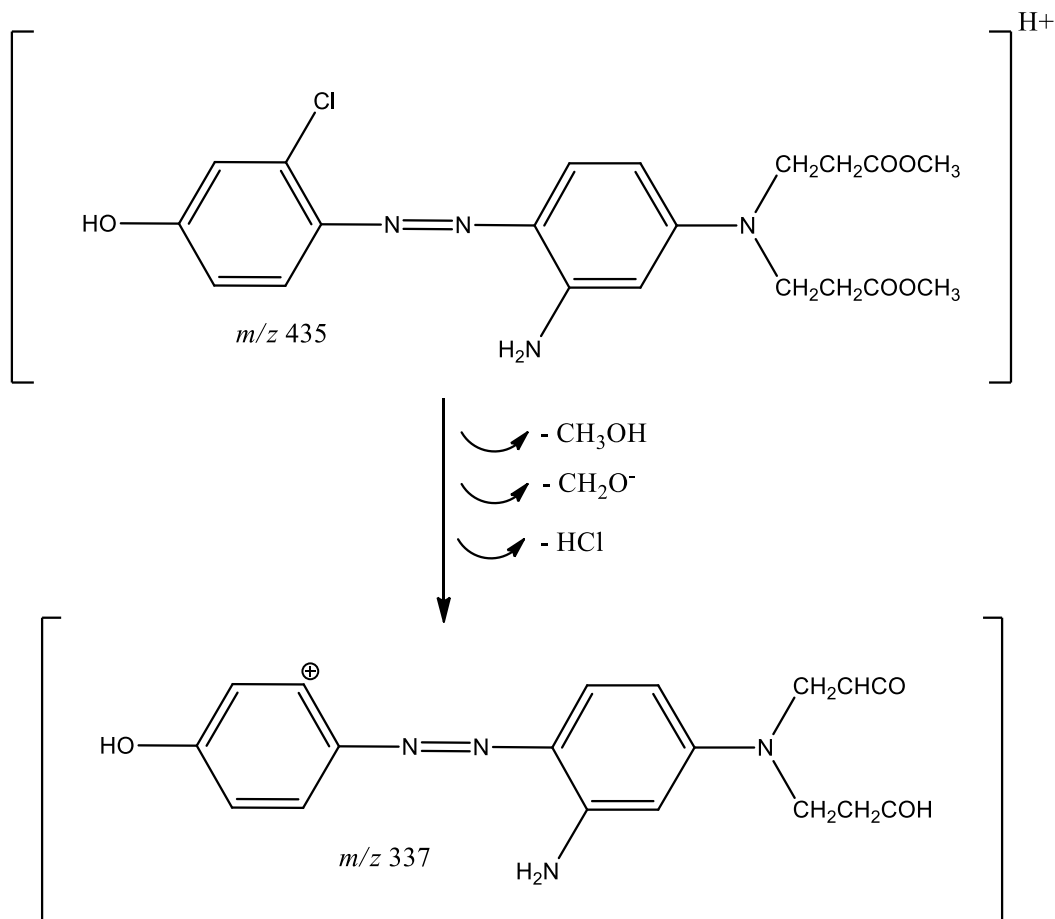
O espectro de massa MS/MS mostrou como principal íon fragmento m/z 337 (pico de base) que corresponde à perda de metanol (32 Da), formaldeído (30 Da) e cloreto (35.5 Da) a partir do substrato (m/z 506). Portanto, este novo metabólito (5) foi atribuído a ácido dipropanóico 3,3'-((4-((2-cloro-4-hidroxifenil)diazenil)fenil)azanodil). A proposta de fragmentação pode ser delineada para os experimentos de LC-MS/MS como ilustra a Figura 26.

Figura 25 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) m/z 435 ($[M + H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com microsoma de fígado de rato. B) Espectro de massas MS/MS (Cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 435.



Fonte: autor do trabalho.

Figura 26 - Fragmentação proposta para o metabólito (5) m/z 435, formado após a incubação de 5 mg L^{-1} do corante padrão DR 167 com microsossoma de fígado de rato.

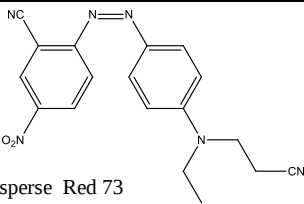
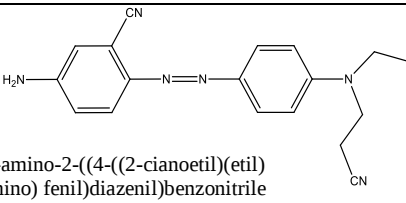
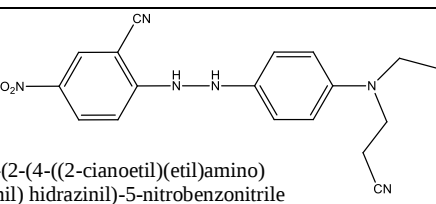
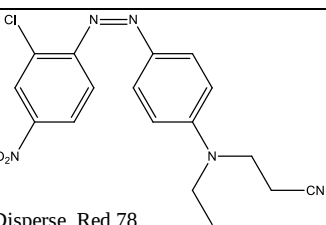
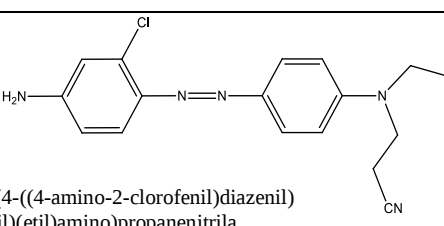
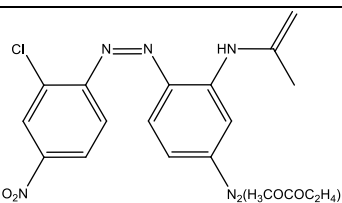
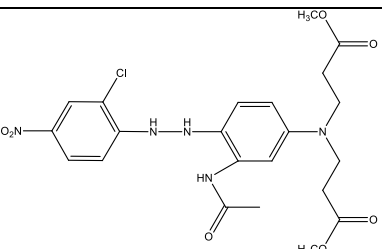


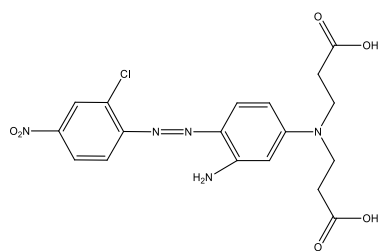
Fonte: autor do trabalho.

Analisando o metabólito obtido (5) (m/z 435) após biotransformação do DR 167, é possível concluir que houve redução da amida, originando uma amina (NH_2), além da perda do grupo nitro ligado ao anel aromático, com subsequente adição de um grupo hidroxila. Considerando que o microsossoma de rato atuou preferivelmente no grupo azo e nitro do corante DR 73 e no grupo nitro do corante DR 78, houve uma atuação diferente da enzima no corante DR 167. Estas mudanças na estrutura da molécula, ocorrem provavelmente devido à estrutura do corante DR 167, que se apresenta muito diferente em comparação com os outros dois corantes, DR 73 e DR 78.

A Tabela 6 resume os produtos obtidos para cada corante disperso após reação com microsossoma de fígado de rato e identificação por LC-MS/MS.

Tabela 6 - Produtos de biotransformação dos corantes Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167 após reação com microsossoma de fígado de rato.

	Corantes	Metabólitos	m/z	Tempo de retenção (min)
	 Disperse Red 73		349	4,84
Produtos de biotransformação		 5-amino-2-((4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)diazenil)benzonitrile	319	3,41
		 2-(2-(4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)hidrazinil)-5-nitrobenzonitrile	351	3,09
	 Disperse Red 78		358	6,76
Produto de biotransformação		 3-((4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)(etil)amino)propanenitrila	328	3,86
	 Disperse Red 167		506	6,20
Produtos de biotransformação		 Dimetil 3,3'-((3-acetamido-4-(2-(2-cloro-4-nitrofenil)hidrazinil)fenil)azanediil) dipropanoato	508	4,56



435

4,21

Ácido propanóico 3,3'-((3-amino-4-((2-cloro-4-nitrofenil)diazenil)fenil) azanediil)

Fonte: autor do trabalho.

A preocupação com o risco carcinogênico dos corantes azo e seus produtos de degradação começou com o estudo publicado por Rehn (1985) como citado em Dipple *et al.* (99), que observaram que os trabalhadores que utilizavam anilina numa fábrica de corante na Alemanha desenvolveram câncer de bexiga. Este fato levou a posteriores testes em animais com vários produtos químicos os quais foram expostos esses trabalhadores, e como consequência, descobriram a atividade carcinogênica do azo corante 20,3-dimetil-4-aminoazobenzeno para o fígado de ratos e camundongos. (99)

Neste contexto, é importante determinar a atividade mutagênica, não só dos corantes azo, mas também dos seus metabólitos, considerando que grandes quantidades destes compostos são utilizados em todo o mundo para processos de coloração e podem atingir o meio ambiente. (100)

Corantes azo podem ser ingeridos por seres humanos e outros seres vivos através do consumo de alimentos ou água contaminados, e eles podem sofrer processos de oxidação ou de redução durante o metabolismo, com a consequente geração de produtos mais ou menos tóxicos do que as moléculas originais. (100) Por isso, é de extrema importância estudar os possíveis produtos formados após o metabolismo do corante azo Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167, considerando que esta classe de corantes mostrou potencial mutagênico no teste de Ames. (101)

No presente trabalho, foram relatadas reações de redução pelo metabolismo *in vitro* utilizando o citocromo P-450 a partir de microsomas de fígado de rato e observou-se que os constituintes do material microssomal do fígado estão intimamente envolvidos na degradação metabólica de corantes azo. Uma variedade de compostos azo têm sido mostrados como substratos em reações de redução por enzimas do fígado de mamíferos, sugerindo que o fato de formação de aminas ser um pré-requisito para a carcinogenicidade. (102)

Os resultados obtidos mostraram que a reação enzimática também alterou o grupo nitro nos corantes DR 73 e DR 78, em que NO_2 foi reduzido a NH_2 , bem como a redução do grupo azo a hidrazo nos corantes DR 73 e DR 167. As estruturas químicas propostas dos metabólitos obtidos neste estudo em relação ao seu risco como compostos mutagênicos ou carcinogênicos ainda não foram relatadas na literatura. No entanto, grupos químicos apresentados nas estruturas dos metabólitos detectados são parte da classificação proposta pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (103) e os mais perigosos para a saúde humana, seja por ingestão ou contato, são: benzonitrila, que é classificada como possivelmente um carcinógeno para os seres humanos, nitrobenzonitrila e propanonitrila. (103)

A estrutura química de cada corante têxtil é de importância fundamental para os possíveis metabólitos que podem ser formados, porque uma propriedade relevante de agentes mutagênicos genotóxicos ambientais está relacionada ao alto caráter eletrofílico da molécula ou do seu derivado. (104) Esta propriedade aumenta com uma possível reação com centros nucleofílicos do DNA, levando à formação de adutos. Se este efeito genotóxico não é reparado, pode acontecer a ocorrência de alterações permanentes no DNA, levando a um efeito mutagênico. (104)

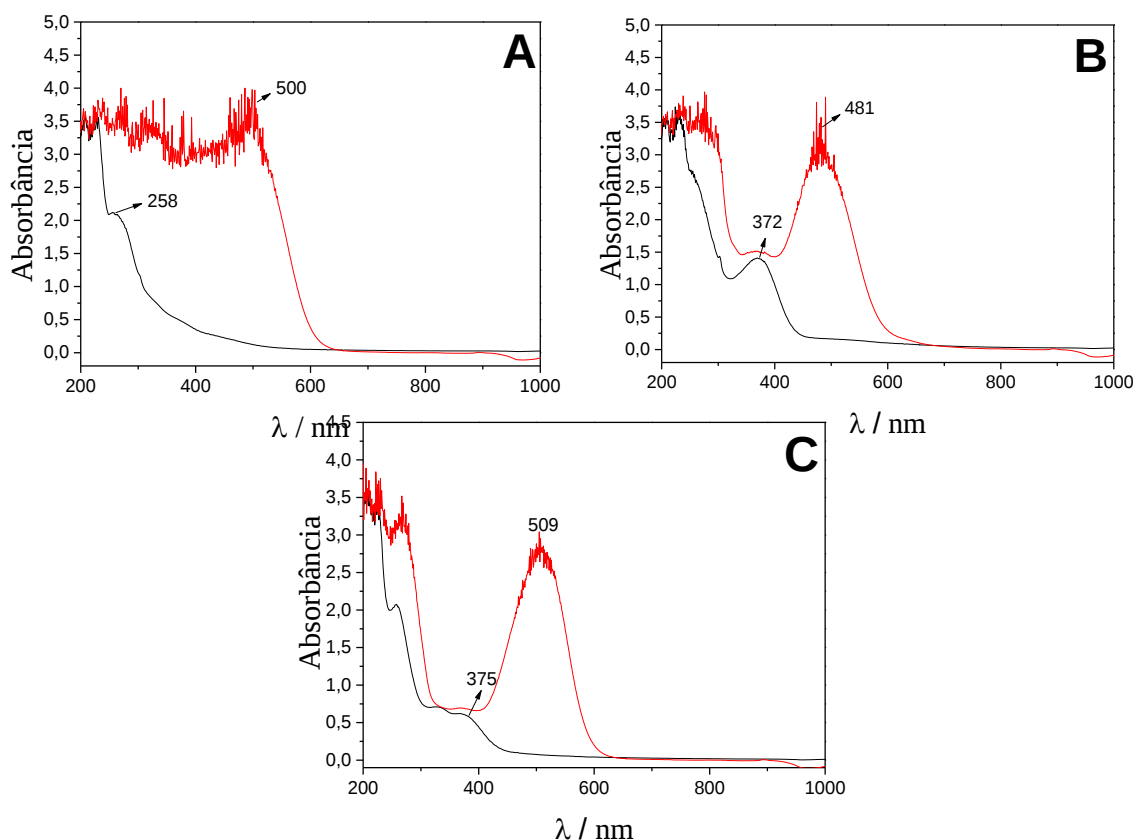
4.5 Descoloração de DR 73, DR 78 e DR 167 pela ação da *Escherichia coli*

A seguir, investigou-se o efeito da bactéria *E. coli* (ATCC 25922) sobre a descoloração dos corantes. A Figura 27 ilustra o espectro de UV-Vis obtido para os corantes: (A) DR 73, (B) DR 78 e (C) DR 167 na concentração de 100 mg L^{-1} antes e após incubação com a *E. coli* a 37°C durante sete dias.

A observação desses espectros indica que os corantes analisados, na ausência de bactéria, apresentaram grupos cromóforos com absorbância máxima nos respectivos comprimentos de onda: Disperse Red 73 ($\lambda = 500 \text{ nm}$), Disperse Red 78 ($\lambda = 481 \text{ nm}$) e Disperse Red 167 ($\lambda = 509 \text{ nm}$). Porém, ao observar os espectros da amostra na presença da bactéria, observa-se a ocorrência de picos na região do ultravioleta para todos os corantes, com absorbância máxima nos respectivos comprimentos de onda: Disperse Red 73 ($\lambda = 258 \text{ nm}$), Disperse Red 78 ($\lambda = 372 \text{ nm}$) e Disperse Red 167 ($\lambda = 375 \text{ nm}$) atribuídos ao caráter aromático presente na molécula do corante, os quais já estavam presentes na amostra padrão (Figura 8), porém, em menor intensidade. Em todos os experimentos observa-se a descoloração das amostras do corante após incubação com a bactéria, passando da tonalidade

vermelha para tonalidade amarela, e perda do grupo cromóforo na molécula com absorbância máxima na região do visível. Estes testes iniciais mostram que a azoreductase poderia estar promovendo a degradação do grupo azo nestes corantes. Sendo assim, novos estudos foram realizados utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD). (105)

Figura 27 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos corantes: Disperse Red 73 (A) Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em uma concentração de 100 mg L^{-1} antes (vermelho) e após (preto) incubação com bactéria *E. coli*.

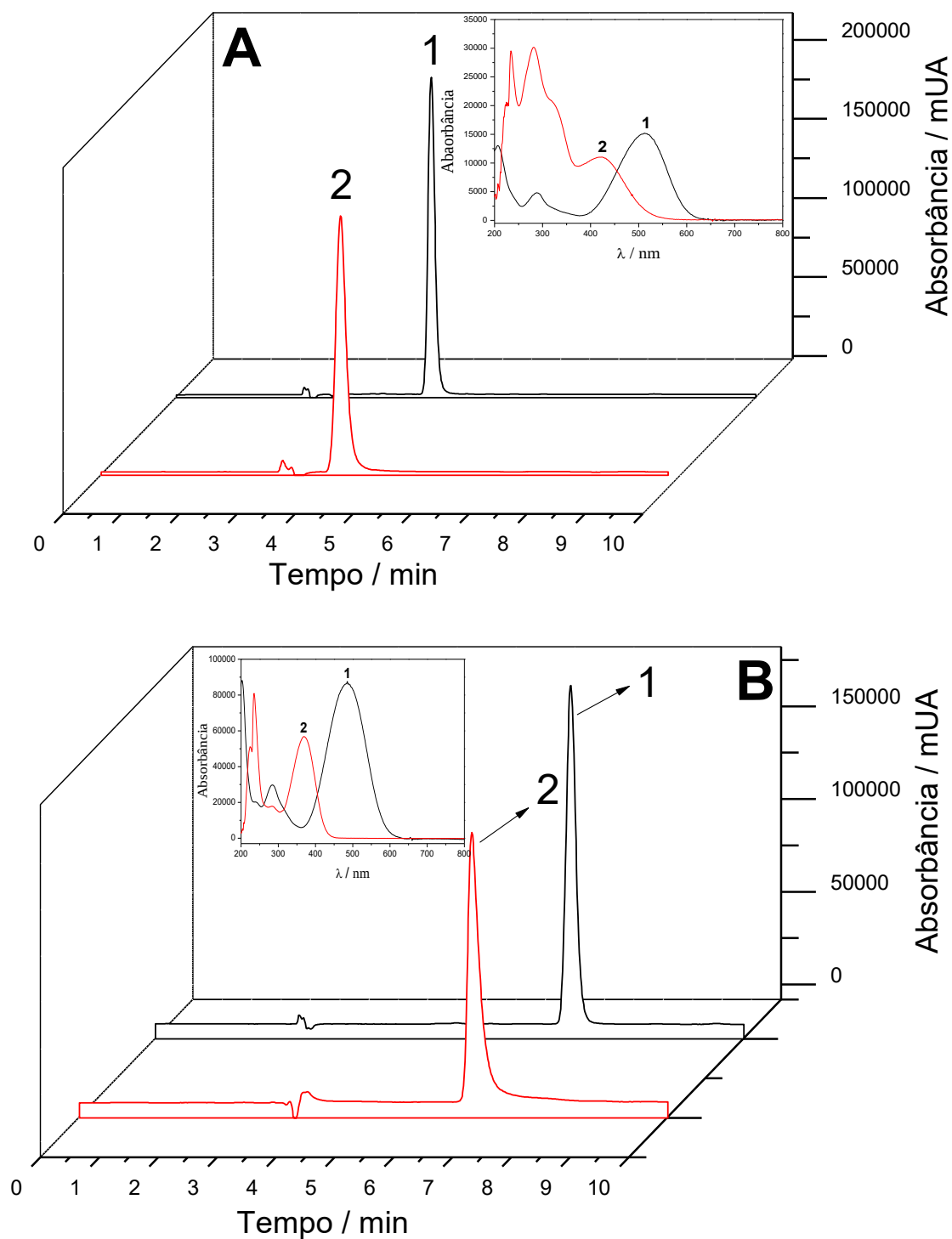


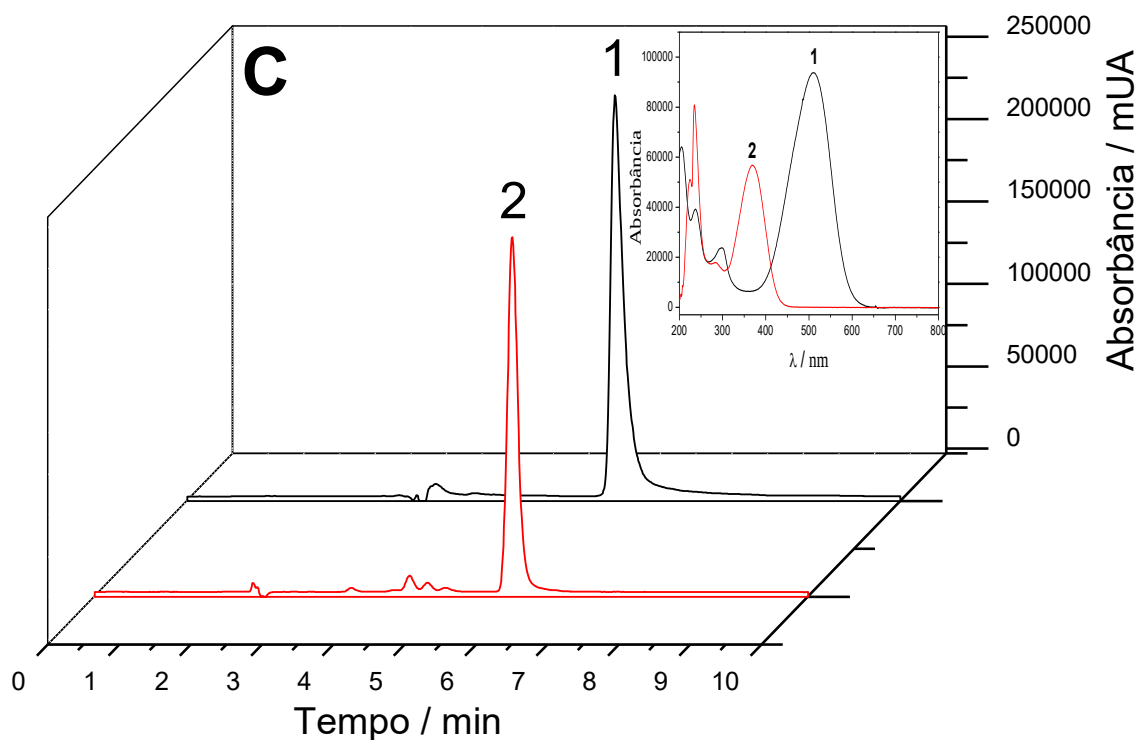
Fonte: autor do trabalho.

4.6 Identificação dos produtos de redução por CLAE-DAD dos corantes DR 73, DR 78 e DR 167 submetidos à reação com *Escherichia coli*

A Figura 28 (A-C, pico 1) compara os respectivos cromatogramas CLAE-DAD antes e após a reação do corante com a *E. coli*, (A-C, pico 2) na concentração de 20 mg L^{-1} . Os espectros de UV-Vis correspondentes para cada corante, antes e após reação, obtidos a partir do detector DAD, estão inseridos nas respectivas Figuras contendo os cromatogramas.

Figura 28 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD: 20 mg L⁻¹ de corantes têxteis após biotransformação com a bactéria *E. coli* (pico 1) e 20 mg L⁻¹ de corante padrão (pico 2): Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila. Condições: Coluna C18, fase móvel de 80:20 ACN/H₂O. Vazão = 1,0 ml min⁻¹. T = 30 ° C. Inserte: Espectros de UV-Vis obtidos para cada pico antes (preto) e após (vermelho) ação enzimática.





Fonte: autor do trabalho.

Picos cromatográficos bem definidos revelaram tempos de retenção de 4,72; 7,08 e 5,24 minutos para os corantes DR 73, DR 78 e DR 167, respectivamente. Após a incubação de DR 73, DR 78 e DR 167 com a bactéria *E. coli* por sete dias, os picos cromatográficos apresentaram diferentes tempo de retenção e emergiram novos picos em tempos de 4,04; 6,03; e 6,13 minutos, respectivamente, para DR 73, DR 78 e DR 167, sugerindo que a ação da bactéria, provavelmente, causou alguma alteração na estrutura dos corantes.

Em geral, espera-se que na reação enzimática haja a clivagem do grupo azo, levando à descoloração da solução dos corantes. Devido ao surgimento de novos produtos, estudos de espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram conduzidos para obter mais informações sobre sua natureza.

4.7 Identificação dos produtos de redução por LC-MS/MS dos corantes DR 73, DR 78 e DR 167 submetidos à reação com *Escherichia coli*

Na análise dos corantes por LC-MS/MS, primeiramente, iniciou-se registrando os espectros no modo full scan MS de m/z 200 a m/z 800. A identificação de potenciais metabólitos foi realizada por comparação dos cromatogramas de íons totais e espectros de massas obtidos para as amostras controle e amostras de biotransformação. Íons alvo

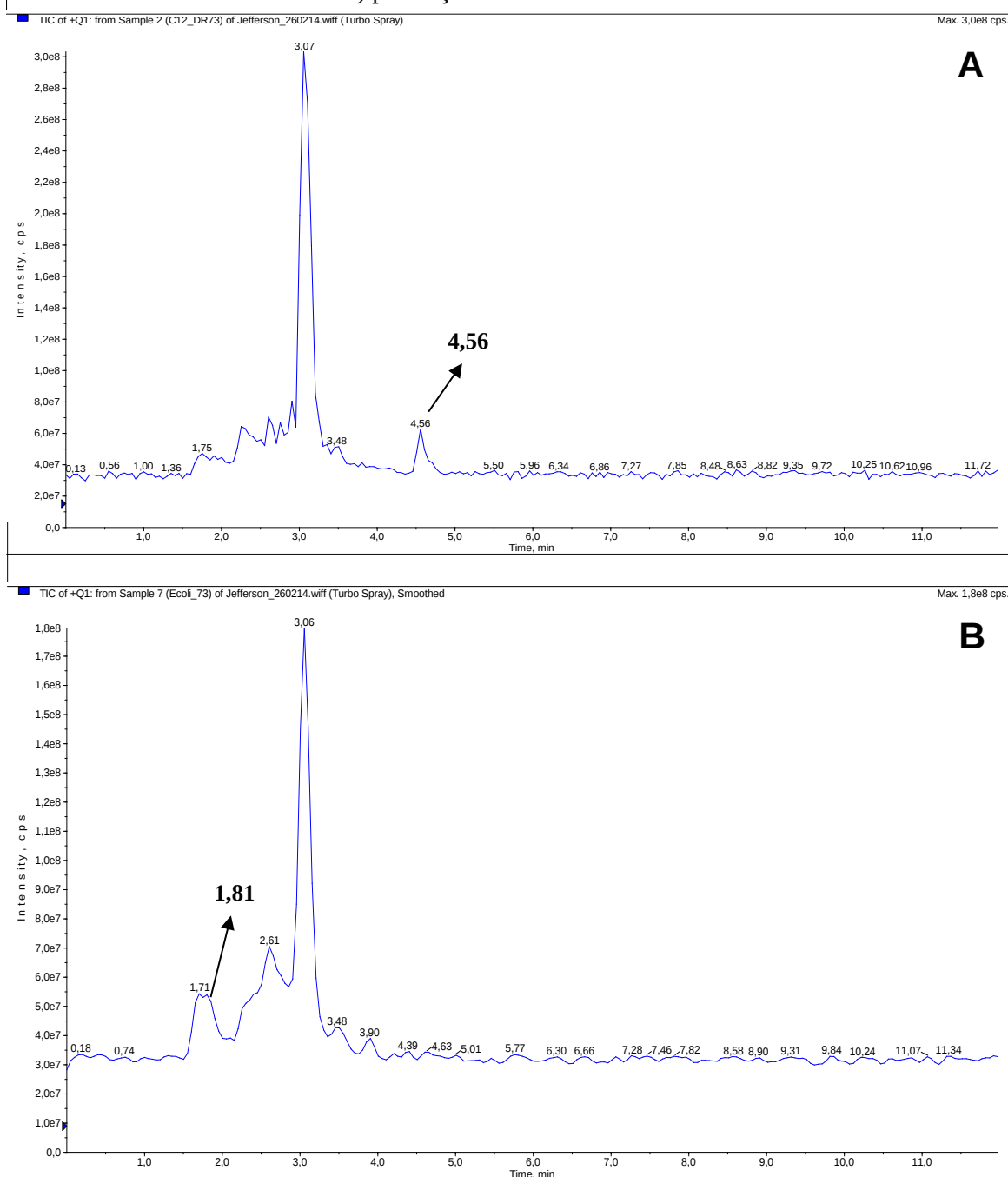
detectados, que não estavam presentes nas amostras de controle foram considerados como potenciais metabólitos.

A seguir, avaliou-se os principais produtos formados por LC-MS/MS, testando cada corante submetido à incubação com *E. coli* durante sete dias.

4.7.1 Corante Disperse Red 73

A Figura 29 ilustra o perfil cromatográfico obtido por LC-MS para o corante DR 73 antes (A) e após (B) incubação com *E. coli*.

Figura 29 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante DR 73 A) na ausência da bactéria *E. coli* e B) presença da bactéria *E. coli*.

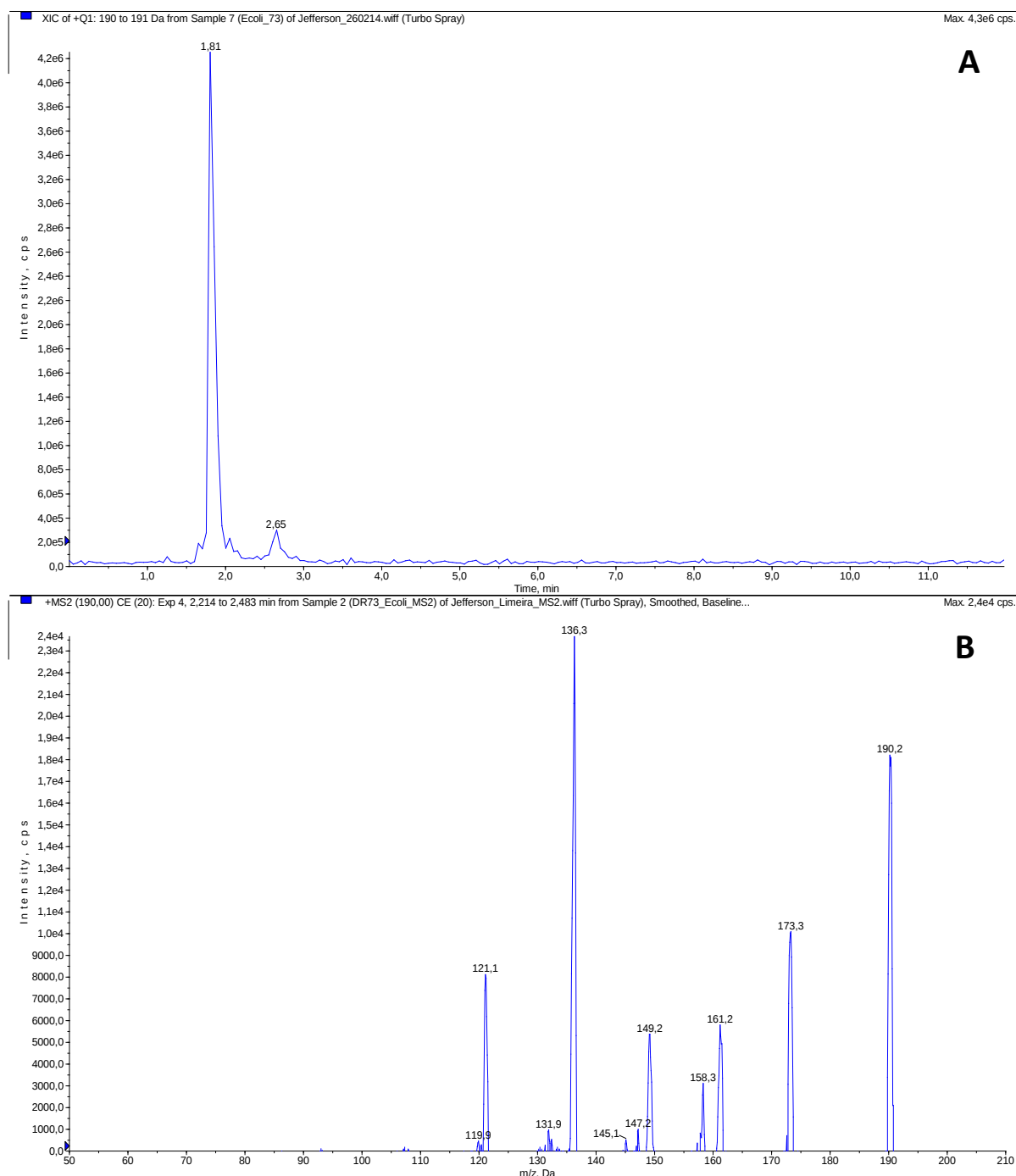


Observa-se que ambos os cromatogramas apresentaram uma banda em torno de 3,06 min referente à glicose e outros compostos presentes no meio de cultura, usada durante crescimento da bactéria (agar nutricional).

As demais bandas observadas, na Figura 29B, são similares com a análise da amostra controle (Figura 29A, amostra contendo corante e meio de cultura, sem a presença da bactéria). Em adição, na Figura 29A, observa-se um pico no tempo de retenção de aproximadamente 4,56 min, atribuído ao corante DR 73. O mesmo não foi observado na figura 29B (presença da bactéria), indicando a total biotransformação do corante DR 73, mas observa-se outro pico em $t_r = 1,81$ min, m/z 190, atribuído a um subproduto gerado após incubação do corante DR 73 com *E. coli*. O cromatograma de íon extraído define melhor este pico na Figura 30.

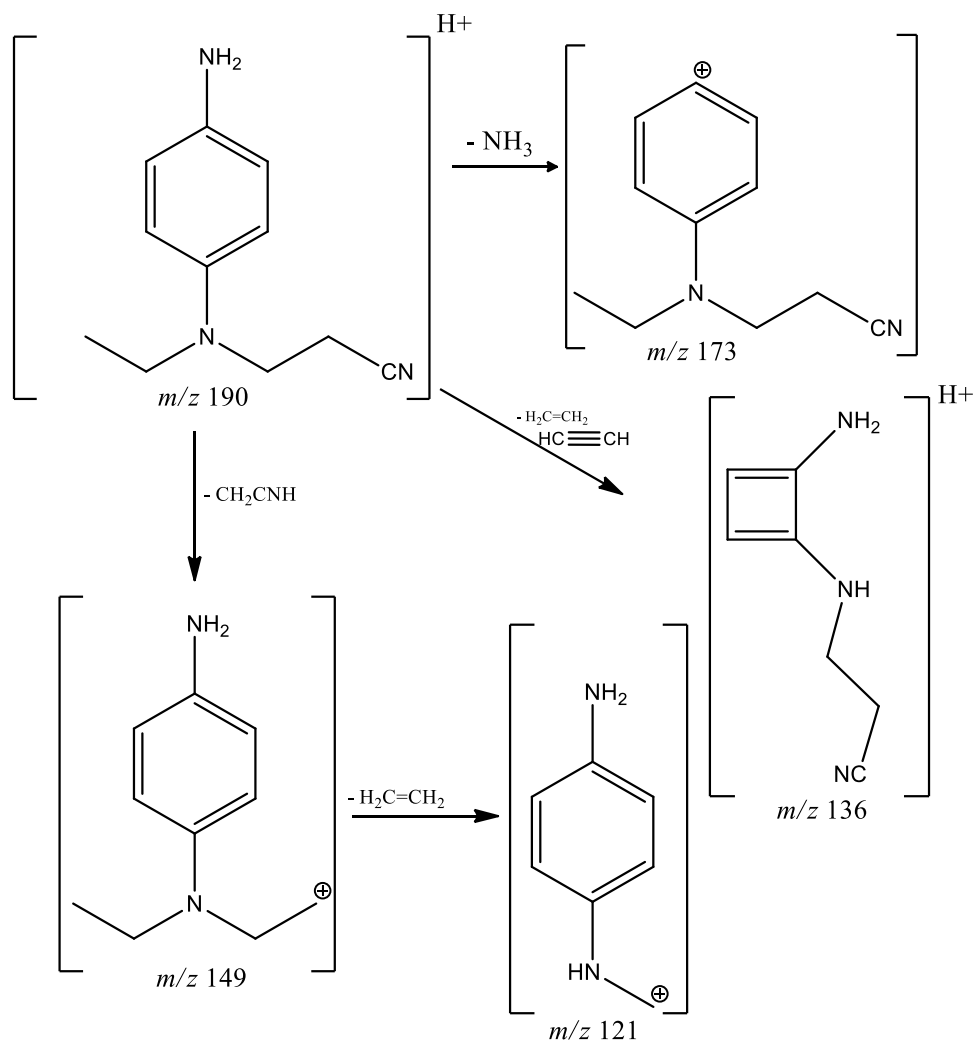
A análise deste pico mostra que a massa 189 Da, correspondente ao íon de m/z 190 ($[M + H]^+$), sugere a formação de uma amina. Análise de íons fragmento (EPI) do íon m/z 190 confirmou a presença de uma amina, 3,4-aminofenil-etil-amino-propanitrila, (Figura 30B). O perfil do espectro de massa MS/MS revelou a ocorrência do íon m/z 136 como o íon fragmento mais intenso (pico base), referente à perda de um etino (26 Da) e um etileno (28 Da). Outros íons foram observados, tais como m/z 173, referente à perda do grupo amina (17 Da) e formação dos íons m/z 149 e m/z 121, referentes à eliminação de um cetenimina e um alceno, respectivamente. Ceteniminas são compostos orgânicos que compartilham um grupo funcional comum e têm a estrutura geral $R_1R_2C=C=NR_3$. Com base no espectro de íons fragmento obtido, 3,4-aminofenil-etil-amino-propanitrila foi o principal produto da biotransformação do DR 73 como mostra a Figura 31.

Figura 30 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 190 ($[M+H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com a *E. coli*. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 190.



Fonte: autor do trabalho.

Figura 31 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 190, formado depois da reação com 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 73 incubado com a *E. coli*, em condições estáticas, a 30 °C durante sete dias.



Fonte: autor do trabalho.

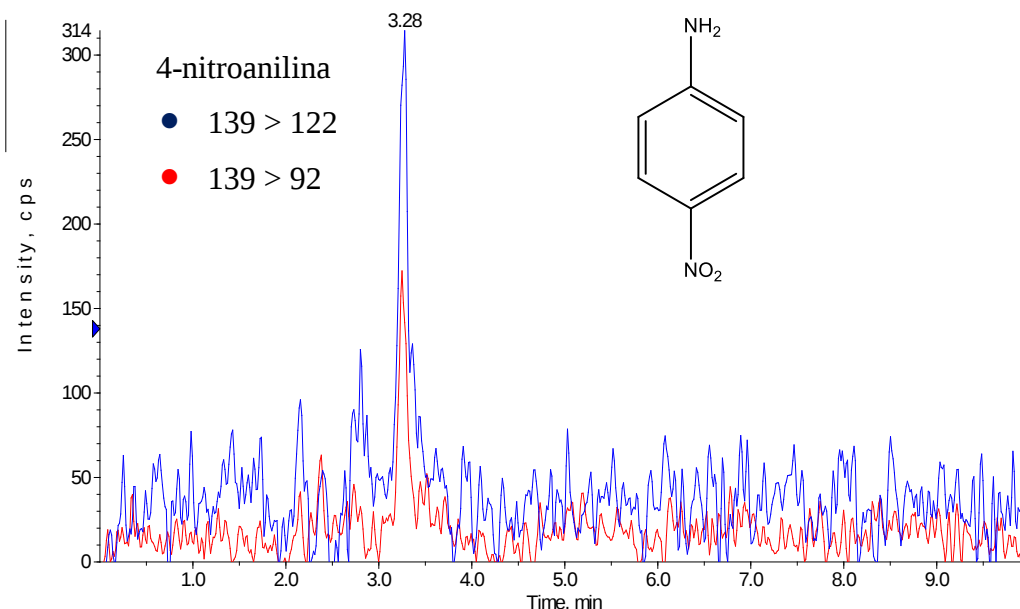
Deste modo, estes resultados indicam que as enzimas produzidas pela *E. coli*, possivelmente azoredutase, promoveram a metabolização do corante DR 73, formando o íon m/z 190, como principal produto, originado pela clivagem do grupo azo do corante.

Com a reação de azoredução confirmada, buscou-se a presença das outras aminas que poderiam ser formadas após a clivagem do grupo azo do corante correspondente.

Para isto, utilizou-se um experimento de LC-MS/MS capaz de detectar os compostos alvo com maior sensibilidade e seletividade na tentativa de se obter maiores informações sobre os produtos gerados. O experimento utilizado foi SRM (Selected Reaction Monitoring) onde duas transições de massas (íon precursor – íon fragmento) foram monitoradas. As análises das amostras na presença e ausência da bactéria *E. coli* (experimento e controle)

revelaram a presença da 4-nitroanilina somente na amostra de biotransformação, como ilustrado na Figura 32 pelo pico cromatográfico em $t_r = 3,28$ min e m/z 139.

Figura 32 - Cromatograma de íons totais (TIC) das duas transições para 4-nitroanilina presentes na amostra experimento (após biotransformação com *E. coli*).



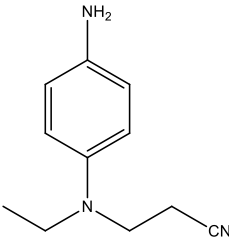
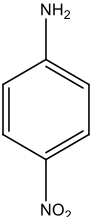
Fonte: autor do trabalho.

Este pico cromatográfico, m/z 139, foi atribuído à formação da 4-nitroanilina. A detecção da 4-nitroanilina pode ser confirmada pela clivagem do grupo azo do corante DR 73 e subsequente eliminação do grupo cianeto. As enzimas nitrila hidratase, amidalase e nitrilase são frequentemente encontradas em bactérias *E. coli*, proporcionando assim a formação desta amina nas condições estudadas.

Dessa forma, o corante DR 73, após incubação com a bactéria *E. coli*, apresentou dois principais produtos de degradação; m/z 190 e m/z 139. A possível ação da enzima azoredutase, promoveu a clivagem do grupo azo que originou diretamente o produto m/z 190 e ainda possibilitou a ação de enzimas do tipo nitrila hidratase que originou o composto m/z 139 (4-nitroanilina) após a eliminação da nitrila.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 73 são resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 73 com enzimas redutoras produzidas pela *E. coli*.

Metabólitos	Estrutura	<i>m/z</i>	Tempo de retenção (min)	Íons fragmento
3-((4-aminofenil)(etil)amino)propanitrila		190	1,82	121,1; 136,3; 149,2; 173,3
4-nitroanilina		139	3,28	122,2; 92,2

Fonte: autor do trabalho.

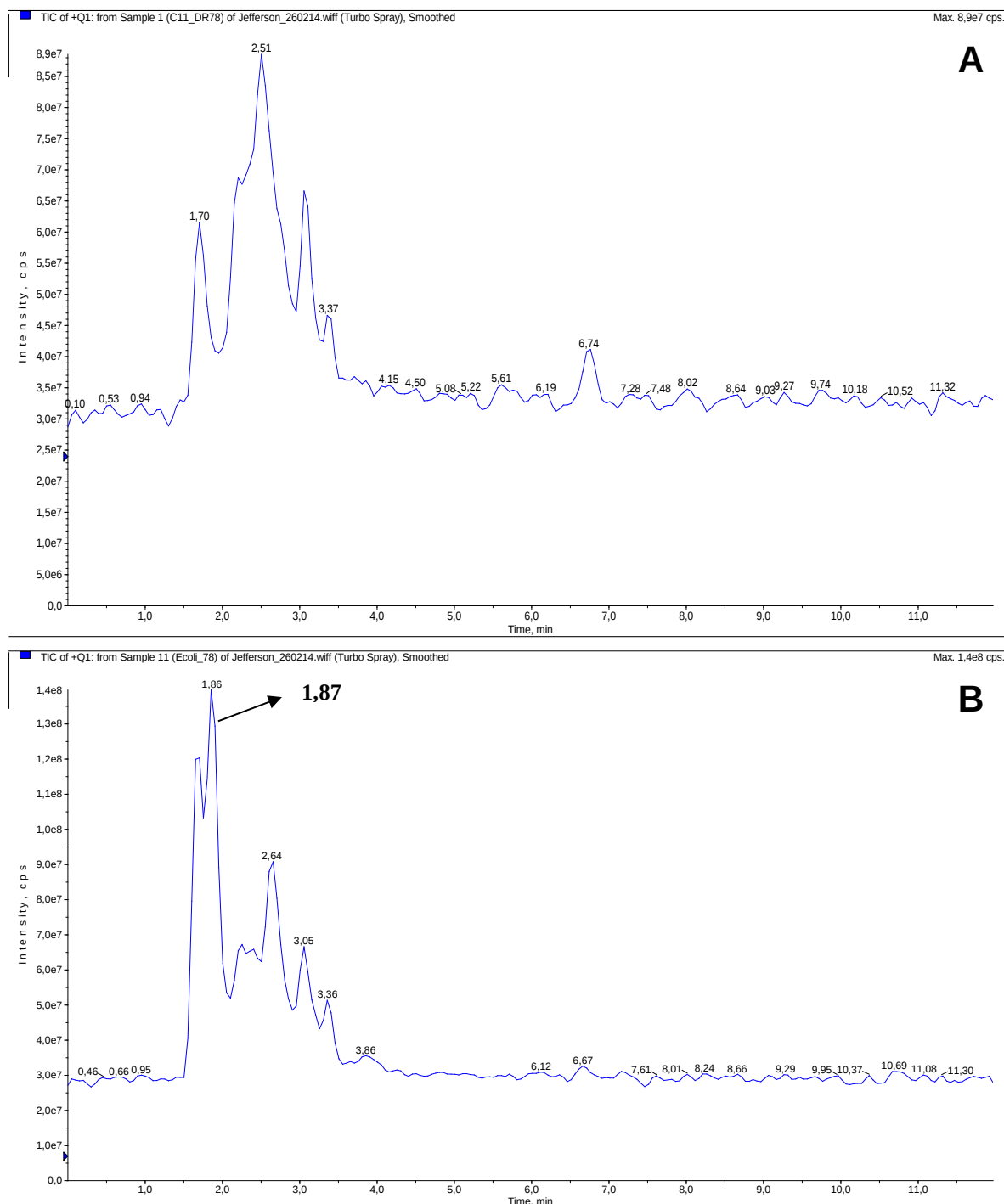
A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) listou algumas aminas aromáticas como possíveis substâncias cancerígenas e perigosas aos seres humanos. Sendo assim, as aminas são classificadas em grupos como 1, 2A, 2B e 3. Os metabólitos também foram avaliados pela Diretiva 76/769/CEE do Parlamento Europeu que trata à respeito da limitação e utilização de algumas substâncias perigosas no mercado. (106-108)

A 4-nitroanilina, um dos metabólitos formados pelo corante DR 73 após reação de biotransformação com a *E. coli*, é considerada tóxica para os seres vivos e meio ambiente, porém, não foi classificada como carcinogênica, nem está presente em grupos de risco avaliados pela IARC. (107)

4.7.2 Corante Disperse Red 78

As investigações sobre os possíveis metabólitos formados para o corante DR 78 foram realizadas. A Figura 33 ilustra o perfil cromatográfico obtido por LC-MS para o corante DR 78 antes (A) e após (B) incubação com *E. coli*.

Figura 33 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante DR 78 A) na ausência da bactéria *E. coli* e B) presença da bactéria *E. coli*.



Fonte: autor do trabalho.

Observa-se que o cromatograma da Figura 33A apresenta uma banda em 1,70 e 2,51 min e a Figura 33B em 2,64 min referente a glicose e à outros compostos presentes no meio de cultura, responsável pelo crescimento da bactéria (agar nutriente), assim como no controle do corante DR 73. Na figura 33B (presença da bactéria), em $t_r = 6,74$ min, observa-se ainda

um pico de pequena intensidade, indicando possível biotransformação do corante DR 78, mas ainda resquícios do corante. No caso do corante DR 78, a ação bacteriana gerou um pico cromatográfico em 1,87 min e m/z 190, como indica a Figura 34, atribuído à 3-4-aminofenil-etil-amino-propanitrila e um outro pico a 4,59 min e m/z 173, atribuído à 2-cloro-4-nitroanilina. Estas atribuições foram confirmadas por SRM, como ilustra a Figura 35.

Figura 34 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 190 ($[M+H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com a *E. coli*. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 190.

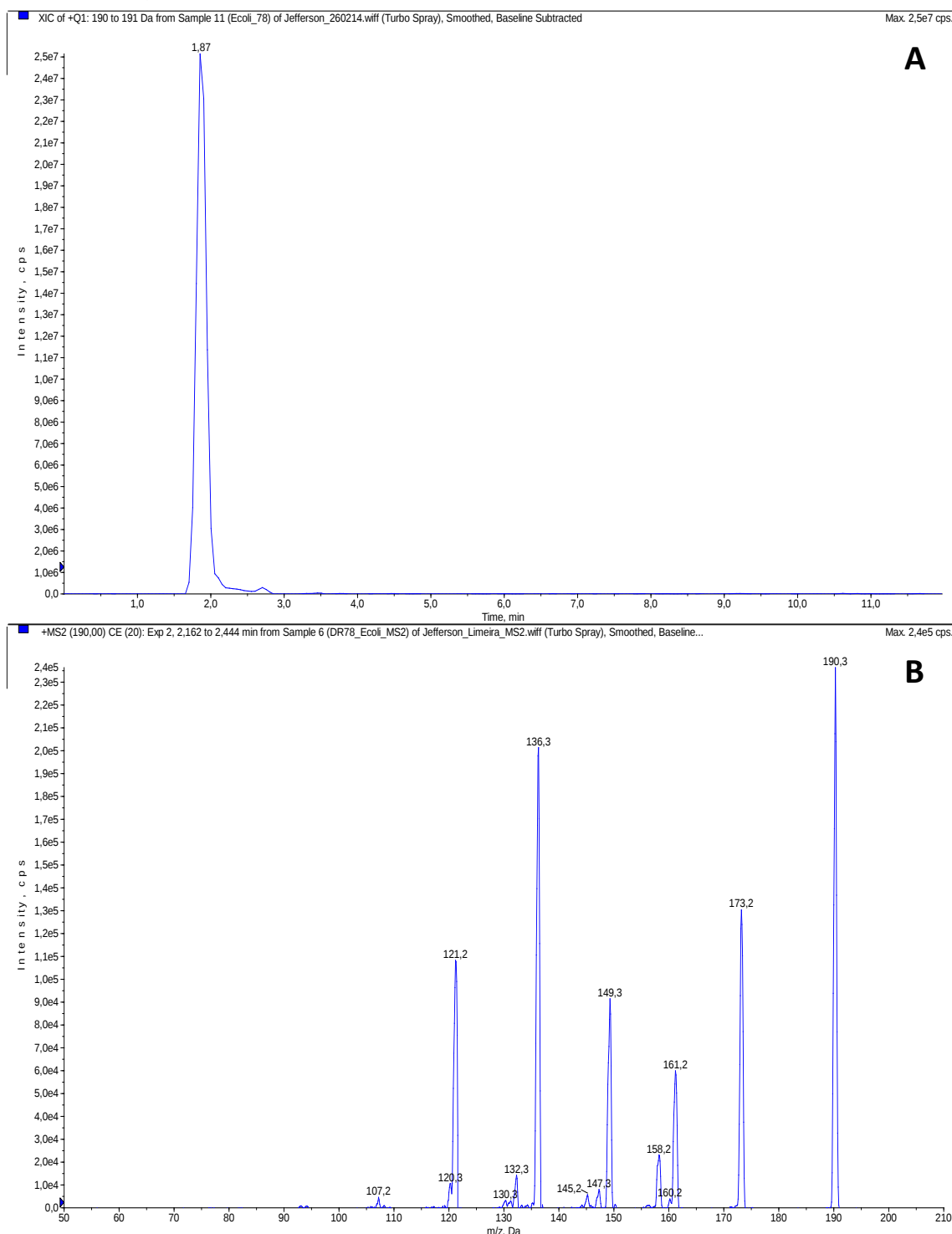
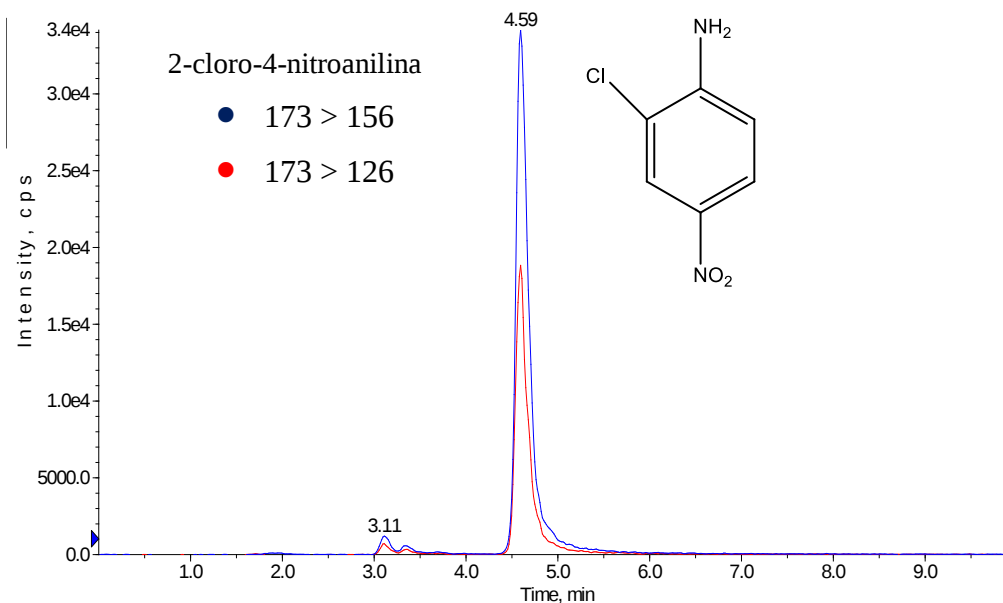


Figura 35 - Cromatograma de íons totais (TIC) das duas transições para 2-cloro-4-nitroanilina presentes na amostra experimento (após biotransformação com *E. coli*).

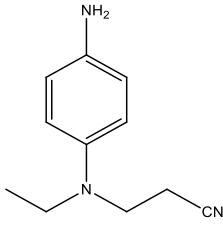
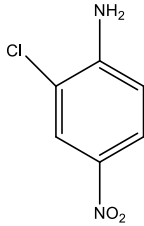


Fonte: autor do trabalho.

Estes resultados indicam que a enzima produzida pela *E. coli* promoveu a clivagem do grupo azo do corante DR 78, o que proporcionou a formação direta dos produtos m/z 190 e m/z 173 (Tabela 8), em $t_r = 1,87$ minutos e $t_r = 4,59$ min, atribuído à 3,4-aminofenil-etil-amino-propanitrila (Figura 31) e 2-cloro-4-nitroanilina, respectivamente. Estes resultados mostram que, ao contrário do corante DR 73, que perdeu a nitrila após a biotransformação, no caso da biotransformação do DR 78, o substituinte cloro foi mantido durante a clivagem do grupo azo e houve a formação de uma amina aromática clorada.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 78 são resumidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 78 com enzimas redutoras produzidas pela *E. coli*.

Metabólitos	Estrutura	<i>m/z</i>	Tempo de retenção (min)	Íons fragmento
3-((4-aminofenil)(etil)amino)propanitrila		190	1,87	121,1; 136,3; 149,2; 173,3
2-cloro-4-nitroanilina		173	4,59	156,2; 126,1

Fonte: autor do trabalho.

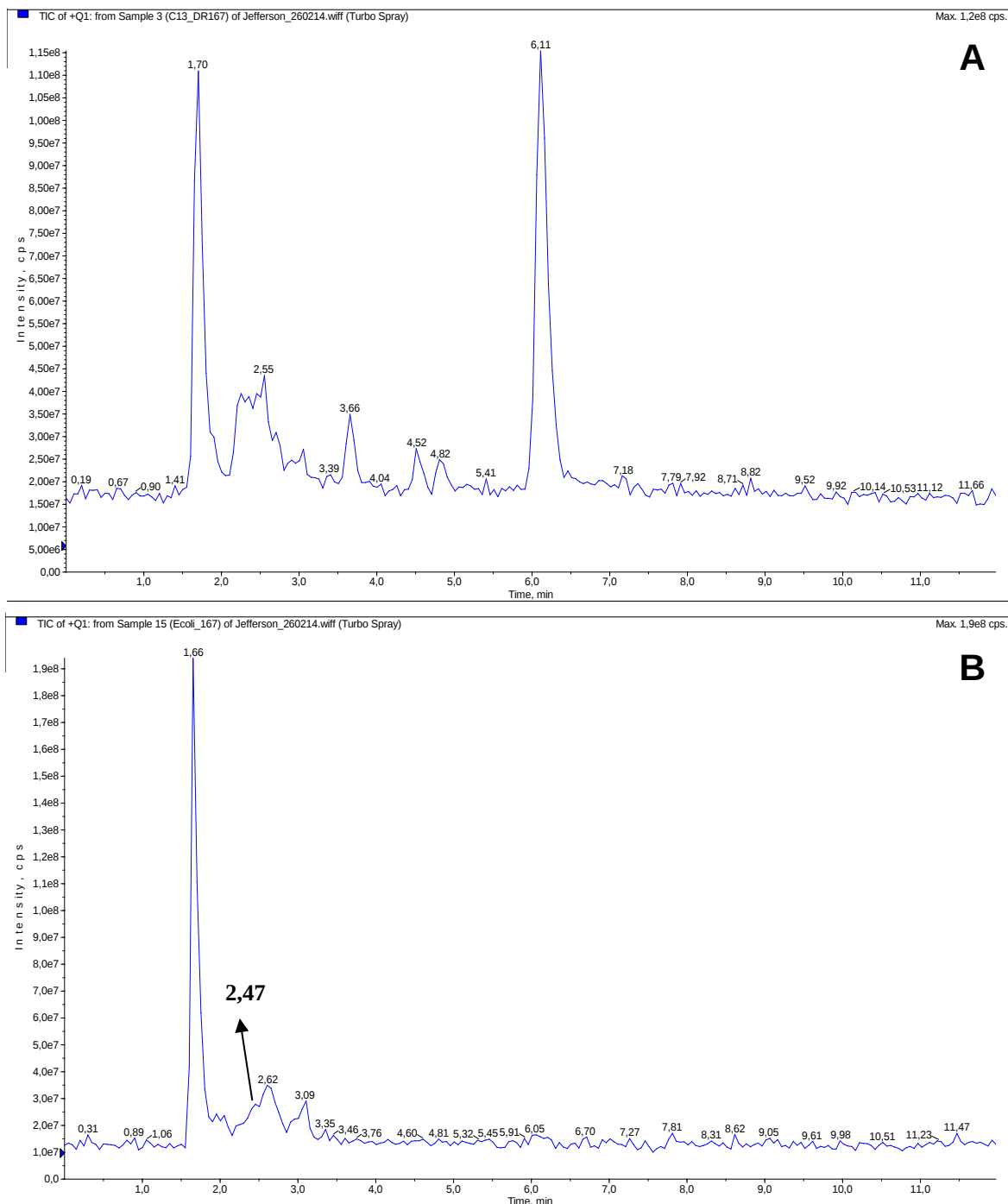
Os dois metabólitos formados após clivagem do corante DR 78 pela ação enzimática da bactéria *E. coli*, resultou em 3-((4-aminofenil)(etil)amino)propanitrila (já citado anteriormente como produto formado do corante DR 73) e 2-cloro-4-nitroanilina.

O produto formado 2-cloro-4-nitroanilina é considerado carcinogênico (categoria 2) pela Directiva 76/769/CEE e está classificado no grupo 2B pela IARC, ou seja, é considerado possivelmente carcinogênico para os seres humanos (106-108).

4.7.3 Corante Disperse Red 167

A Figura 36 mostra o cromatograma de íons totais obtido por LC-MS para o corante DR 167 antes (A) e após (B) incubação com *E. coli*.

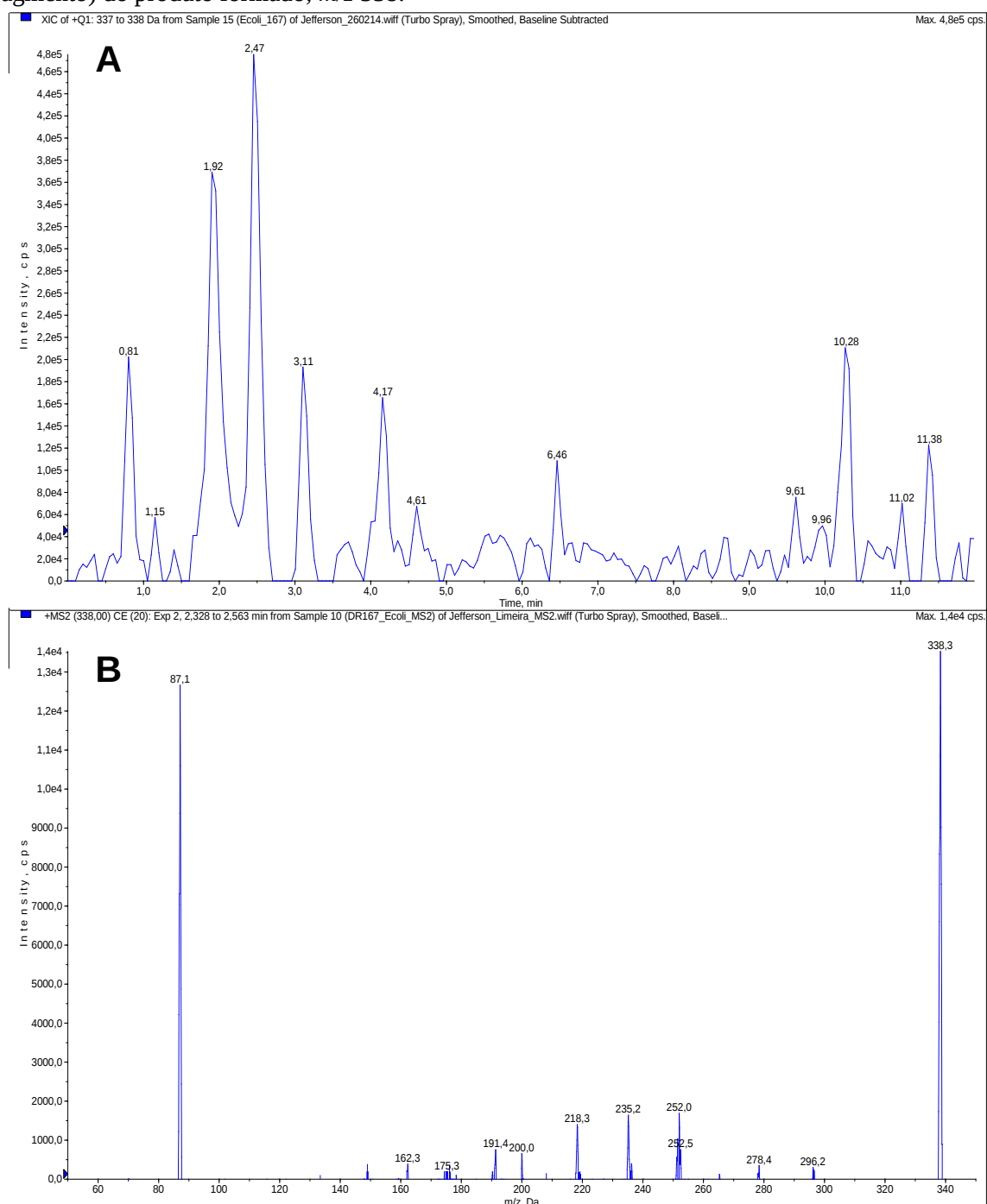
Figura 36 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante DR 167 A) na ausência da bactéria *E. coli* e B) presença da bactéria *E. coli*.



Fonte: autor do trabalho.

Na Figura 36A, o corante DR 167 é detectado como m/z 506 ($[M + H]^+$) e tempo de retenção de 6,11 min. O mesmo íon não foi detectado na amostra tratada com *E. coli* (Figura 36B), indicando a total degradação do corante. O espectro de LC-MS/MS obtido após biotransformação do corante DR 167 revelou um pico em $t_r = 2,47$ min, m/z 338, como indica a Figura 37.

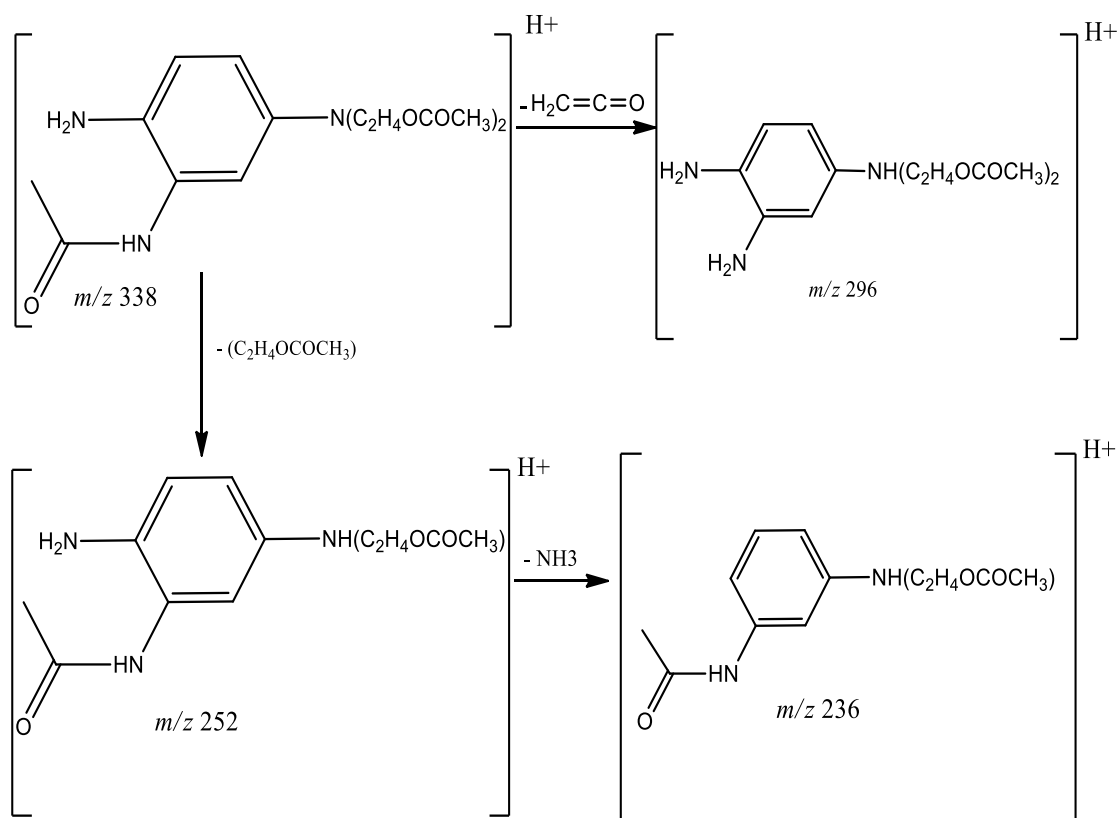
Figura 37 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 338 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a *E. coli*. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 338.



Fonte: autor do trabalho.

Este pico é atribuído à amina de m/z 338 $[M+H]^+$ correspondente à 3,3'-3-acetamido-4-aminofenil-azanodiil-dipropanoato. A análise de íons fragmentos de m/z 338 e a análise MS/MS nos ajudou a confirmar esta hipótese. A Figura 37B ilustra o espectro de massas do experimento de íons fragmento do íon m/z 338, que apresentou como íon fragmento mais intenso m/z 87,1, referente a estrutura $C_2H_4OCOCH_3$. Outros íons foram observados tais como o m/z 296, referente a eliminação do grupo funcional acetila ($-COCH_3$), o m/z 252, referente a perda de $C_2H_4OCOCH_3$ posicionado como um dos ligantes da amina terciária da molécula do corante e o m/z 236, referente a perda de NH_3 em relação ao íon m/z 252. Com base no espectro de íons fragmento, o produto proposto confirmou a formação de dimetil 3,3'-3-acetamido-4-aminofenil-azanodiil-dipropanoato (337 Da, detectado no modo positivo como m/z 338). A Figura 38 ilustra a proposta de fragmentação para o produto, m/z 338, obtido da biotransformação do DR 167.

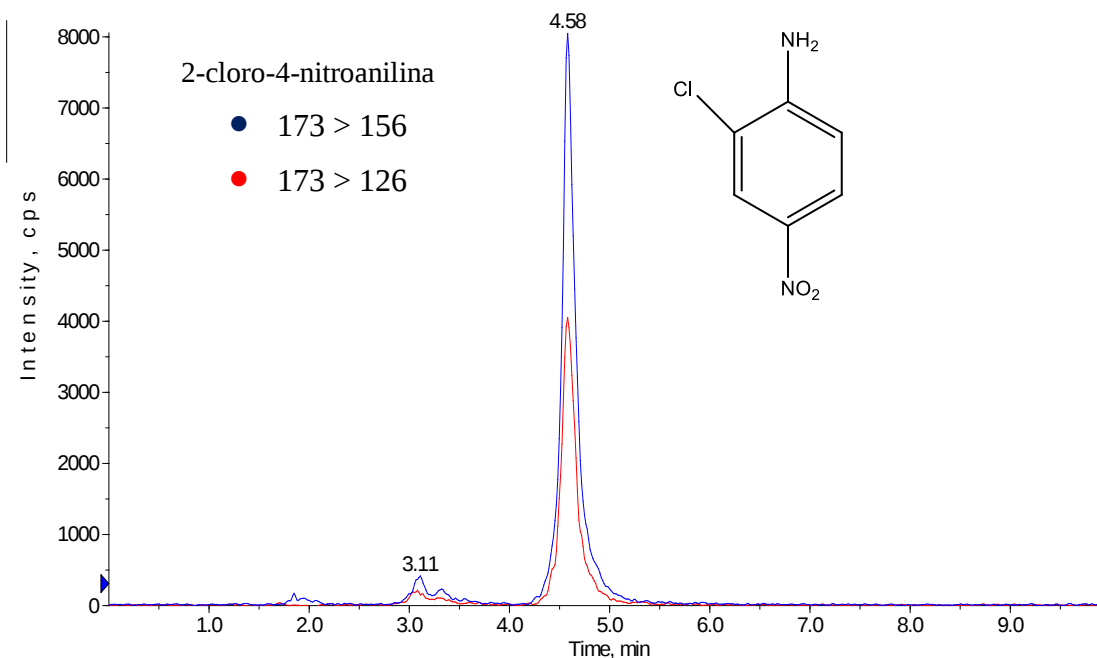
Figura 38 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 338, formado depois da reação com 20 mg L^{-1} do corante padrão DR 167 incubado com a *E. coli*, em condições estáticas, a 30 °C durante sete dias.



Fonte: autor do trabalho.

O cromatograma obtido por SRM para a amostra tratada com *E. coli* mostrou claramente a ocorrência do produto 2-cloro-4-nitroanilina, detectado em $t_r = 4,58$ min, m/z 173, como mostra a Figura 39.

Figura 39 - Cromatograma de íons totais (TIC) das duas transições para 2-cloro-4-nitroanilina presentes na amostra experimento (após biotransformação com *E. coli*).

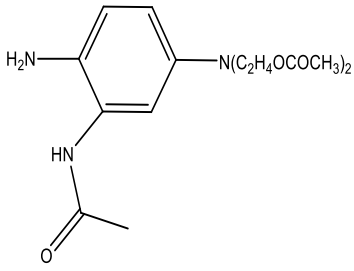
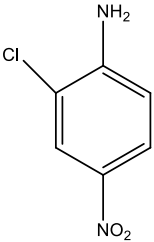


Fonte: autor do trabalho.

Deste modo, concluiu-se que sob ação da enzima, o corante DR 167 foi metabolizado em dois produtos de degradação com m/z 190 e m/z 173. Este último corresponde a 2-cloro-4-nitroanilina e indica que, ao contrário do substituinte CN^- na estrutura do corante DR 73, e semelhante ao corante DR 78, o substituinte cloro também não foi removido durante a biotransformação do corante DR 167.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 167 são resumidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 167 com enzimas redutoras produzidas pela *E. coli*.

Metabólitos	Estrutura	m/z	Tempo de retenção (min)	Íons fragmento
Dimetil 3,3'-((3-acetamido-4-aminofenil)azanediyl)dipropionato		338	2,47	296,3; 252,0; 236,0; 87,1
2-cloro-4-nitrofanilina		173	4,58	156,2; 126,1

Fonte: autor do trabalho.

Os dois produtos de biotransformação do corante DR 167 após clivagem do grupo azo com ação da bactéria *E. coli* foram: Dimetil 3,3'-((3-acetamido-4-aminofenil)azanediyl)dipropionato e 2-cloro-4-nitroanilina. O primeiro produto não foi encontrado na literatura e o segundo, 2-cloro-4-nitroanilina, já foi citado e descrito como um dos produtos formados pelo corante DR 78.

A descoloração de corantes azo através da azoredução por ação microbiana, tem sido extensivamente investigada nos últimos anos. Vários estudos foram publicados sobre este assunto (2), mas, apenas alguns relatam sobre biodegradação total ou parcial, com subsequente formação de outros metabólitos, tais como aminas aromáticas.

As aminas identificadas neste trabalho, representam um risco significativo de bioacumulação no meio ambiente. (107) Assim, os efeitos, em grande parte desconhecidos, de corantes azo e de seus possíveis produtos de degradação, como aminas aromáticas, torna-se um alvo desejável para estudos de monitoramento de descarga e distribuição ambiental desses compostos em águas de efluentes e mananciais. (107)

Embora a Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (IARC) inclua apenas corantes à base de benzidina no seu Grupo 2A e 8 corantes no Grupo 2B, dos quais a maioria são corantes azo, a possibilidade de azo redução desses compostos originando aminas aromáticas tem sido demonstrada para uma variedade de condições ecológicas, incluindo aquelas

encontradas no trato digestivo dos mamíferos (108). Portanto, a maior parte da atenção sobre os possíveis riscos decorrentes da utilização de corantes azo foi transferido para os seus produtos de redução.

A emenda da Diretiva 76/769 / CEE, estabeleceu, em nível europeu, a atenção devida ao caso particular de corantes azo à medida que são utilizados na indústria têxtil. A Diretiva 2002/61 do Conselho e Parlamento europeu, alterou a Diretiva 76/769, decretando o controle das emissões de aminas aromáticas e sua limitação no mercado especificamente decorrentes do tingimento de tecidos com azo corantes e baniu mais de 20 aminas aromáticas oriundas dos mesmos (106).

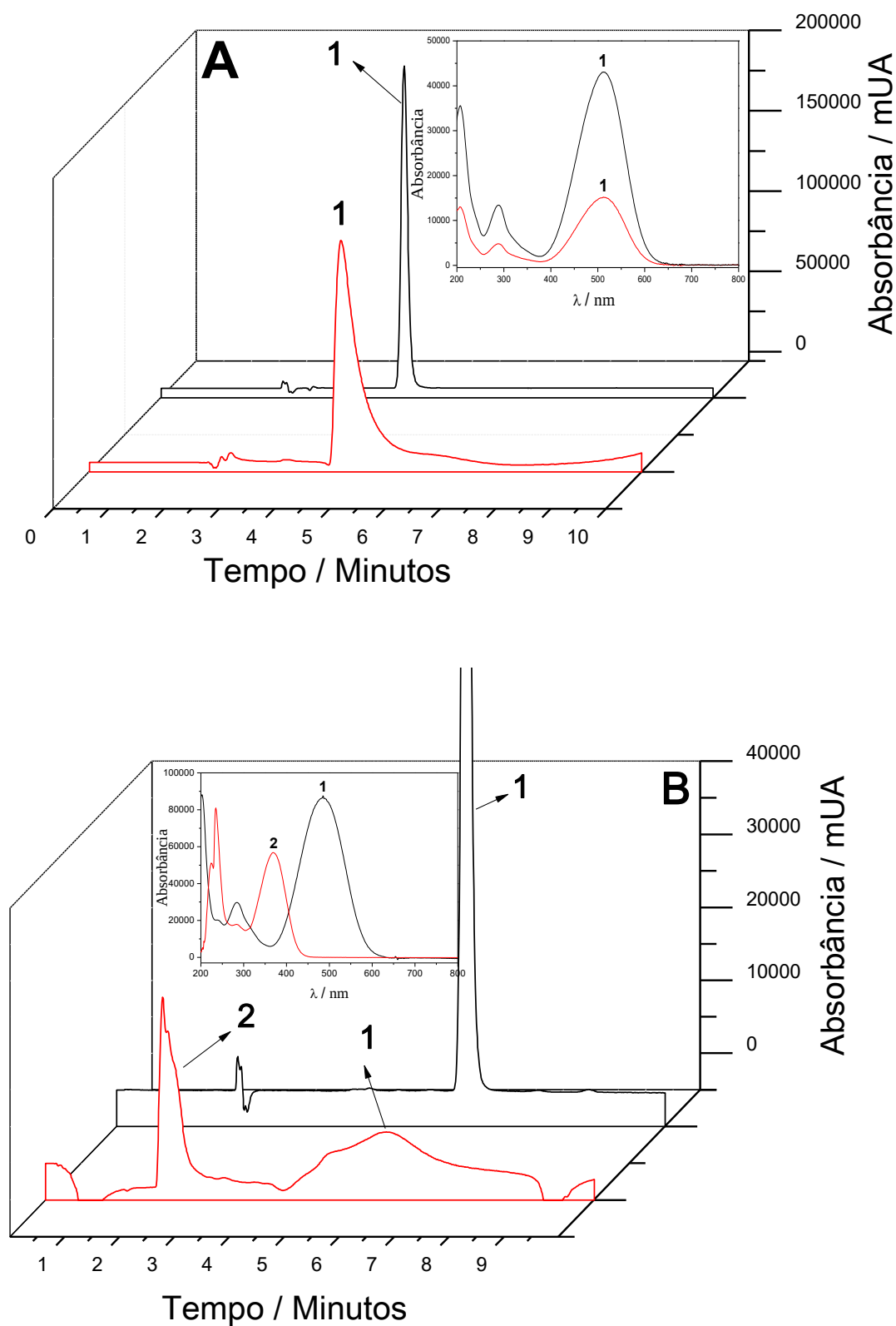
4.8 Análises dos possíveis metabólitos formados pela reação dos corantes DR 73, DR 78 e DR 167 com a enzima nitroredutase.

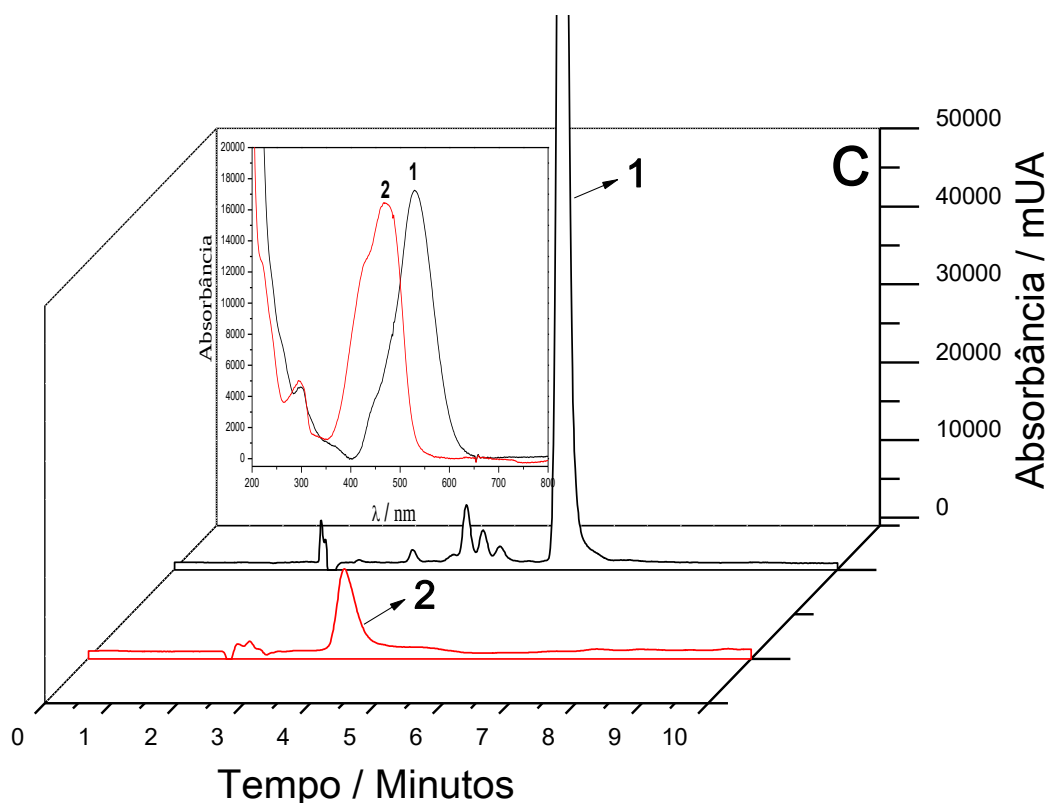
Considerando que as principais enzimas da microflora intestinal são azoredutase e nitroredutase, investigou-se a seguir a metabolização dos corantes têxteis selecionados pela ação da enzima nitroredutase usando técnicas cromatográficas de CLAE-DAD e espectrometria de massas.

As degradações dos corantes têxteis via reação enzimática foram estudadas usando a seguintes metodologia previamente otimizada: 20 μL de corante têxtil (20 mg L^{-1}), 50 μL de enzima nitroredutase (2 mg mL^{-1}), 20 μL de NADPH (10 mmol L^{-1}) em 310 μL de tampão de fosfato (pH 7,0). As soluções foram aquecidas a 90°C e agitadas em 700 rpm por 60 min em Eppendorf Thermomixer[®].

A Figura 40 (A-C) mostra os cromatogramas de CLAE-DAD obtidos para 20 mg L^{-1} dos corantes (A) DR 73, (B) DR 78 e (C) DR 167 antes (1) e após (2) ação da enzima nitroredutase usando as seguintes condições: coluna C18, fase móvel = ACN/ H_2O 80 : 20 (v/v), vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $T = 30^\circ\text{C}$. Na mesma figura são comparados os espectros de UV-Vis obtidos no modo hidrodinâmico para os corantes antes (preto) e após (vermelho) degradação enzimática.

Figura 40 - Cromatogramas de CLAE-DAD registrados para 20 mg L⁻¹ dos corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila obtida através da coluna C-18, fase móvel 80:20 ACN / H₂O.vazão = 1,0 ml min⁻¹.T = 30 ° C. Detecção: λ = 510 nm; 488 nm e 512 nm, para Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167, respectivamente. Inserte: Espectros de UV-Vis obtidos para cada pico antes (preto) e após (vermelho) ação enzimática.





Fonte: autor do trabalho.

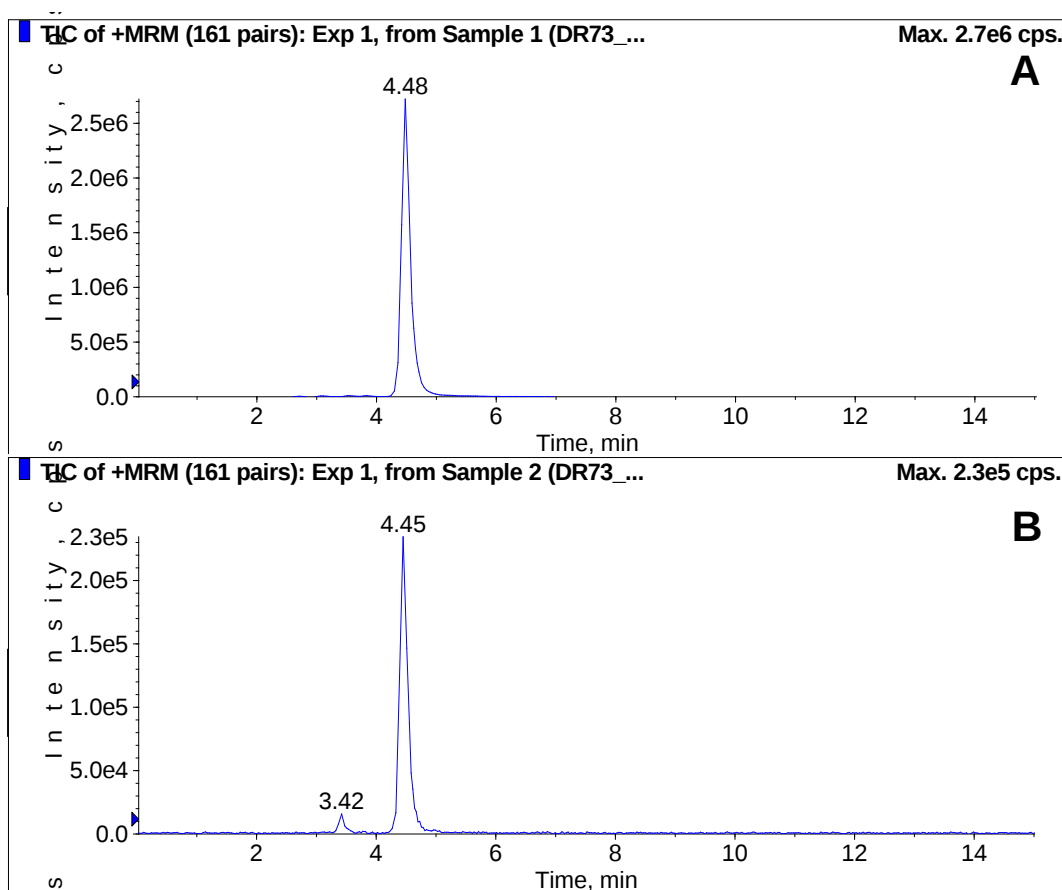
Picos cromatográficos (1) bem definidos foram obtidos para os corantes DR 73, DR 78 e DR 167 antes da reação enzimática em tempos de retenção de 4,42; 6,36 e 5,85 minutos, respectivamente. Após a reação com a enzima nitroredutase em solução, observaram-se novos picos cromatográficos (2) em tempos de retenção de 2,13 e 3,96 minutos, para os corantes DR 78 e DR 167, respectivamente. Os picos cromatográficos (1) que aparecem para os corantes DR 73 ($t_r = 4,68$ min) e DR 78 ($t_r = 6,36$ min) após reação enzimática (em vermelho), são atribuídos à resíduos do corante ainda em solução, indicando que não houve total degradação dos mesmos. A porcentagem de degradação de cada corante foi calculada de acordo com os valores da área de cada pico cromatográfico antes e após ação enzimática e observou-se a seguinte redução: 40% para o corante DR 73, 97% para o corante DR 78 e 100% para o corante DR 167.

A seguir, investigou-se os possíveis produtos formados pela técnica de LC-MS/MS. Inicialmente, espectros no modo full scan foram registrados com o intuito de detectar qualquer metabólito através da aquisição de dados entre m/z 200 a m/z 800. A identificação de potenciais metabólitos foi realizada por comparação dos cromatogramas de íons totais e espectros de massas obtidos para as amostras correspondente ao controle e biotransformação.

Íons alvo detectados, que não estavam presentes nas amostras de controle foram considerados como potenciais metabólitos.

A Figura 41 apresenta o perfil cromatográfico (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 73 antes (A) e após (B) reação com a nitroreductase. Observa-se que ambos os cromatogramas apresentaram uma banda em torno de 4,45 min, referente ao corante padrão DR 73. No entanto, a solução do padrão obtido para o corante DR 73 aqui foi diluída duas vezes.

Figura 41 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante DR 73 A) antes da reação com nitroreductase (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroreductase.

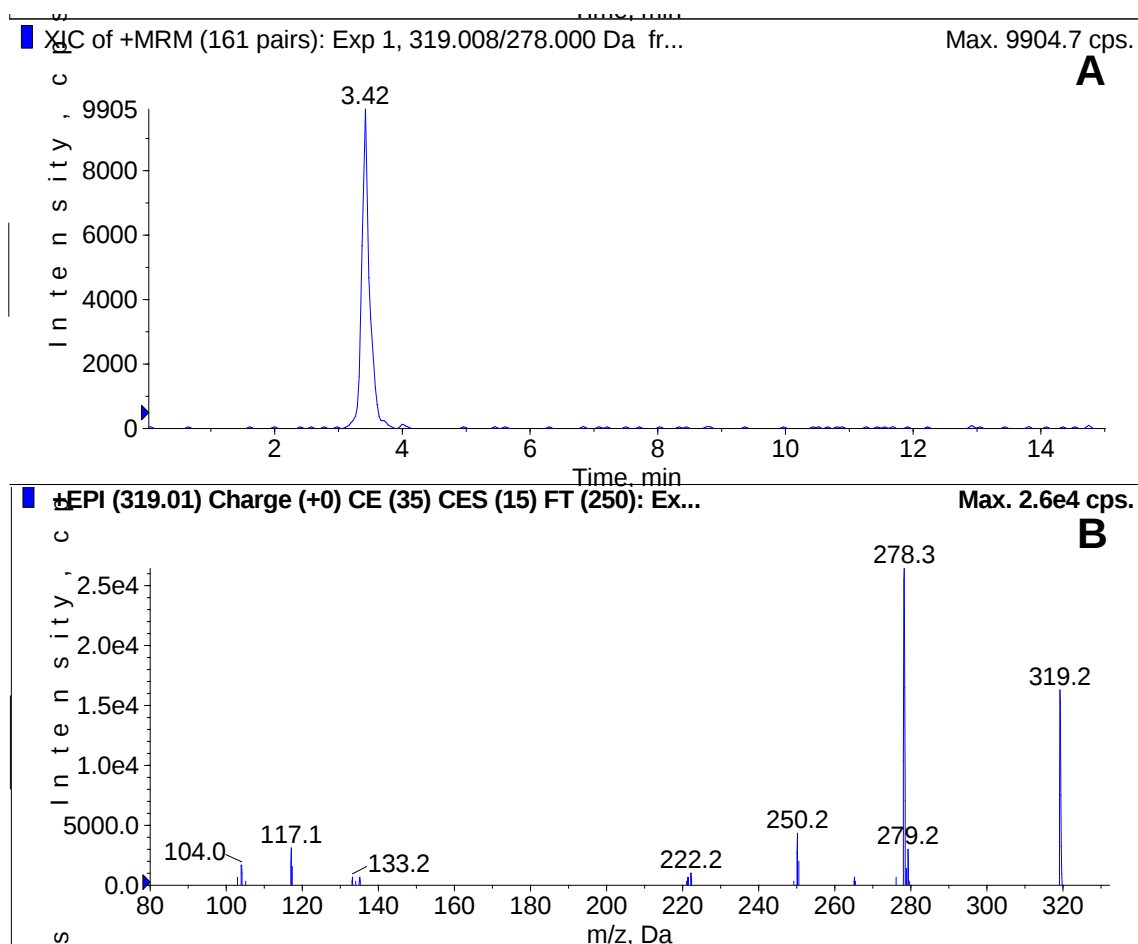


Fonte: autor do trabalho.

Além de resíduos do corante DR73, observou-se uma nova banda cromatográfica em $t_r = 3,42$ min, indicando um possível produto de biotransformação do corante DR 73 após reação com a enzima nitroreductase.

A Figura 42 mostra o XIC e o espectro de massas para o pico de $t_r = 3,42$ min, m/z 319, obtido após redução do DR 73 pela enzima nitroreductase.

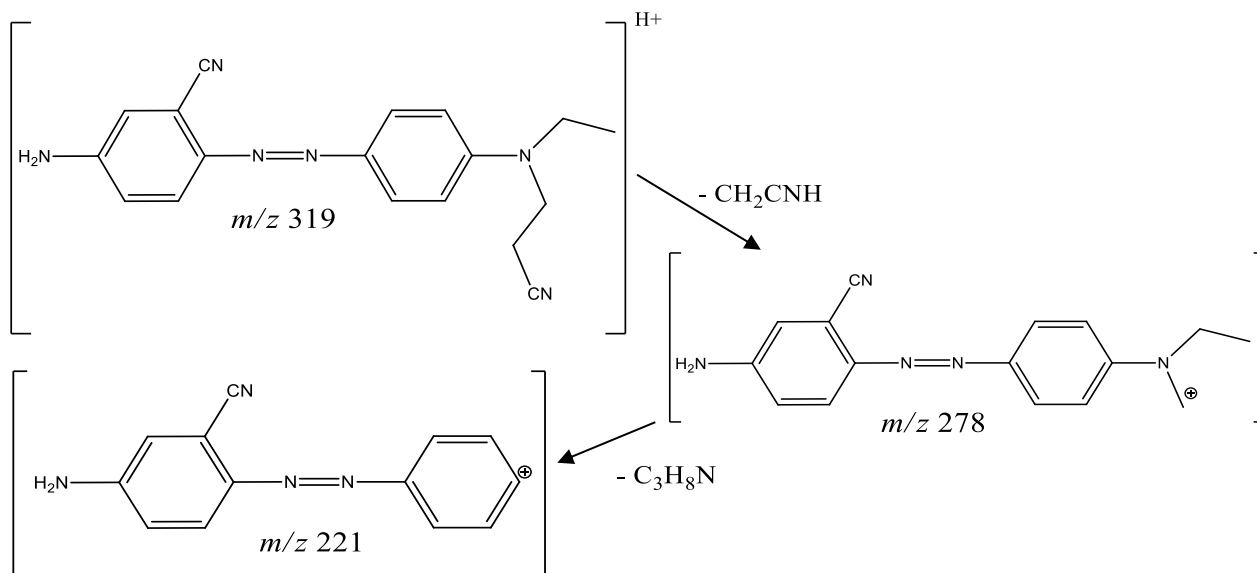
Figura 42 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 319 ($[M+H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 319.



Fonte: autor do trabalho.

A análise deste pico mostra que a massa 318 Da, corresponde ao íon de m/z 319 ($[M + H]^+$), pode ser atribuído a um composto químico em que houve a redução do grupo nitro. A análise de íons fragmento (EPI) do íon m/z 319 confirmou a presença de um novo metabólito (Figura 42B). O espectro de massas, fragmentos de (EPI), revelou como íon fragmento mais intenso m/z 278 (pico base) um composto formado pela perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 222, indicando a perda da amina dissubstituída, a qual estava ligada ao anel aromático. Portanto, este novo metabólito foi atribuído à 2-(2-(4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)hidrazinil)-5-nitrobenzonitrila como o produto principal após a biotransformação do corante DR 73. Uma proposta de fragmentação foi descrita para os experimentos de LC-MS/MS, como mostrado na Figura 43.

Figura 43 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 319, formado após a incubação de 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 73 com a enzima nitroredutase.



Fonte: autor do trabalho.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 73 são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 73 com a enzima nitroredutase livre no meio reacional.

Tipo de reação	Metabólitos	Estrutura	m/z	Tempo de retenção (min)	Íons fragmento
Enzima livre no meio reacional	2-(2-(4-((2-cianoetil) (etil)amino)fenil) hidrazinil)-5-nitrobenzonitrila		319	3,42	278,3; 222,2

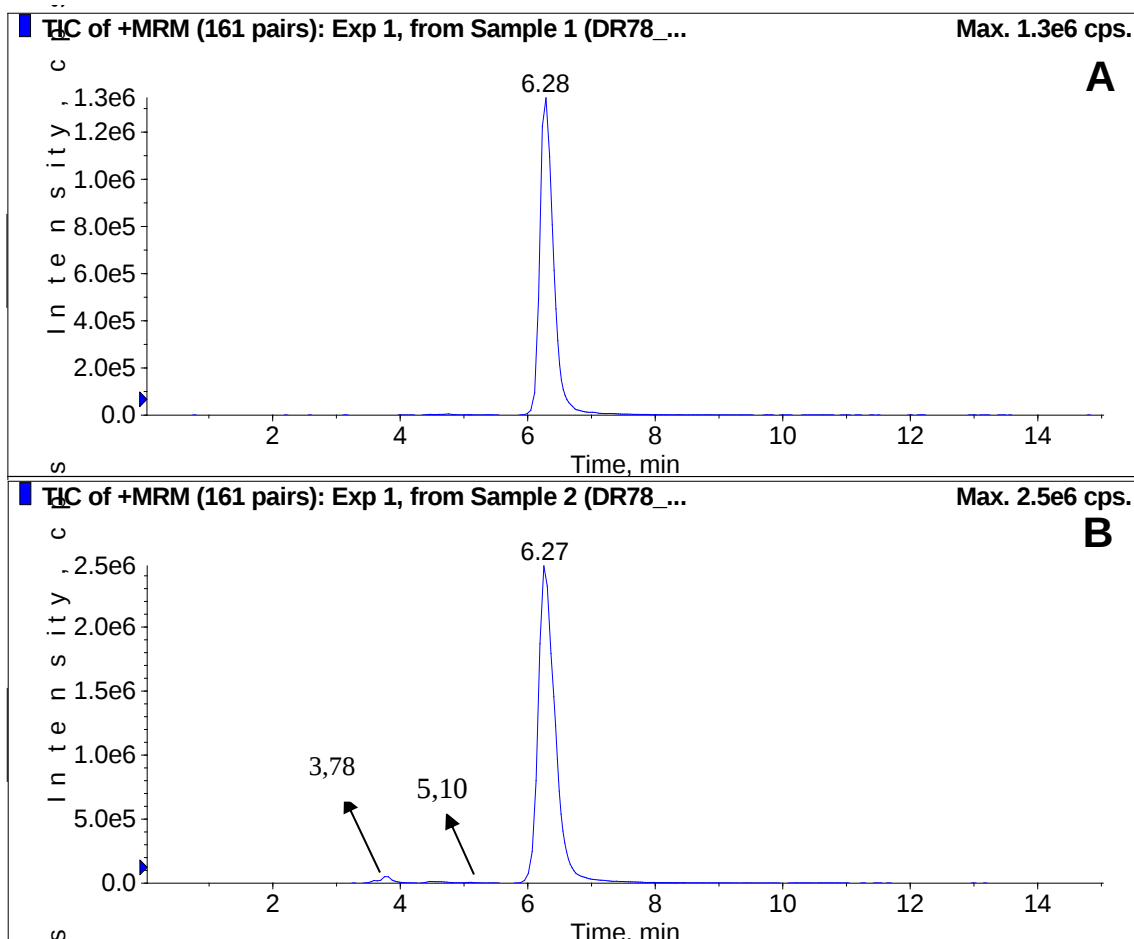
Fonte: autor do trabalho.

Estes resultados mostram que o corante DR 73 é parcialmente metabolizado pela enzima nitroredutase e pode produzir o corante com o grupo nitro reduzido e formação da amina correspondente.

4.8.1.1 Biotransformação do corante DR 78 pela ação da nitroredutase em solução

A Figura 44 apresentou o perfil cromatográfico (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 78 antes (A) e após (B) reação com a nitroredutase.

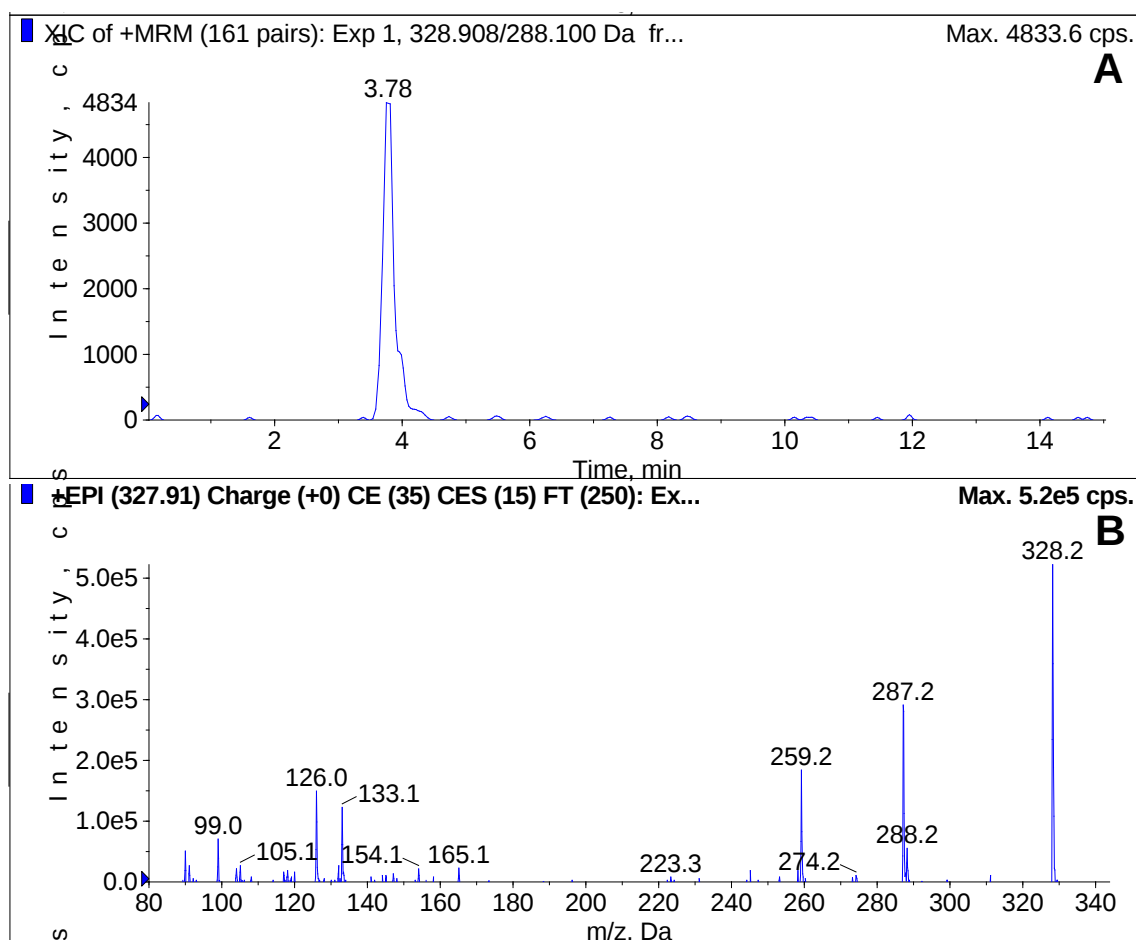
Figura 44 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante DR 78 A) antes da reação com nitroreductase (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroreductase.



Fonte: autor do trabalho.

Nos cromatogramas obtidos para as amostras de controle e de biotransformação, pode-se observar um pico intenso em torno de 6,28 min, o qual corresponde ao corante padrão DR 78, um pico em $t_r = 3,78$ com m/z 328 ($[M + H]^+$) e outro pico em 5,10 min de m/z 324 ($[M + H]^+$). O cromatograma de íon extraído para $t_r = 3,78$ é mostrado na Figura 45.

Figura 45 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 328 ($[M+H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectros de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 328.

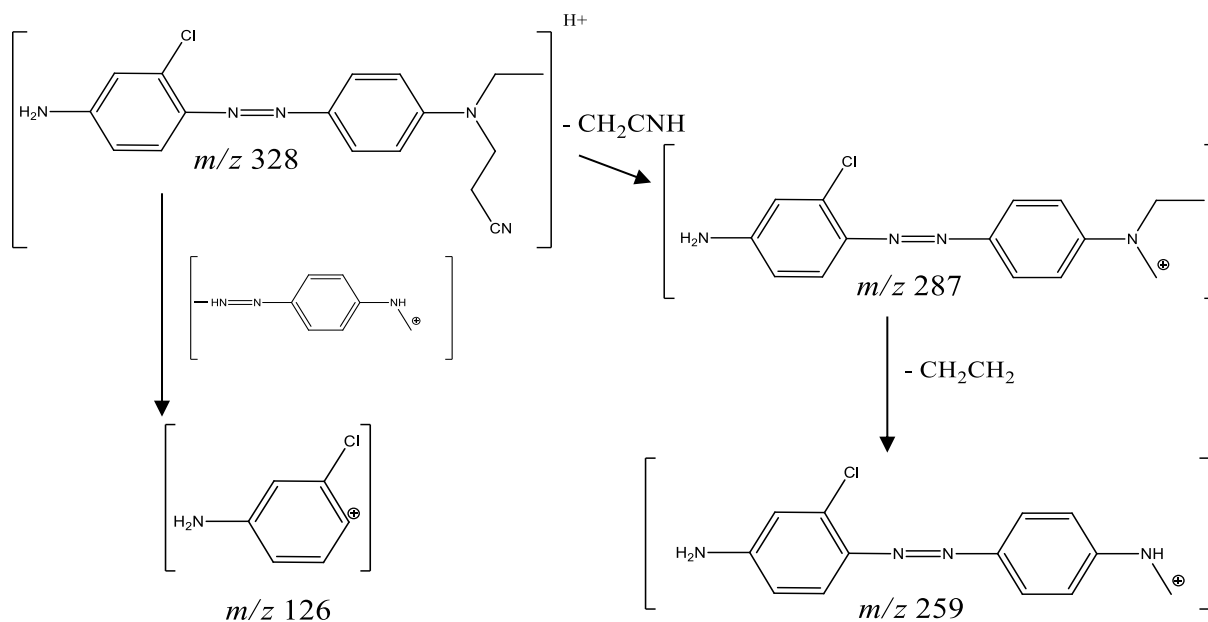


Fonte: autor do trabalho.

O íon de m/z 328 indica a presença de um novo metabólito, a diferença de massa de 30 Da para o íon molecular indica uma redução no grupo nitro, ($-\text{NO}_2$) a NH_2 . O possível produto foi confirmado pela análise de íons fragmento (EPI) de m/z 328. A Figura 45B ilustra o espectro de massa de íons fragmento, o íon fragmento mais intenso m/z 287 (pico base) corresponde à perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 259, indicando a perda de um grupo etila. Além disso, o íon m/z 126 foi também observado e está correlacionado com a clivagem da ligação entre a amina do grupo azo com o anel aromático que contém o cloro e o grupo NH_2 reduzido. Portanto, este novo metabólito foi atribuído à 3-((4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)(etil)amino)propanenitrila como o produto formado após a biotransformação do corante DR 78.

A proposta fragmentação para os experimentos de LC-MS/MS é mostrada na Figura 46.

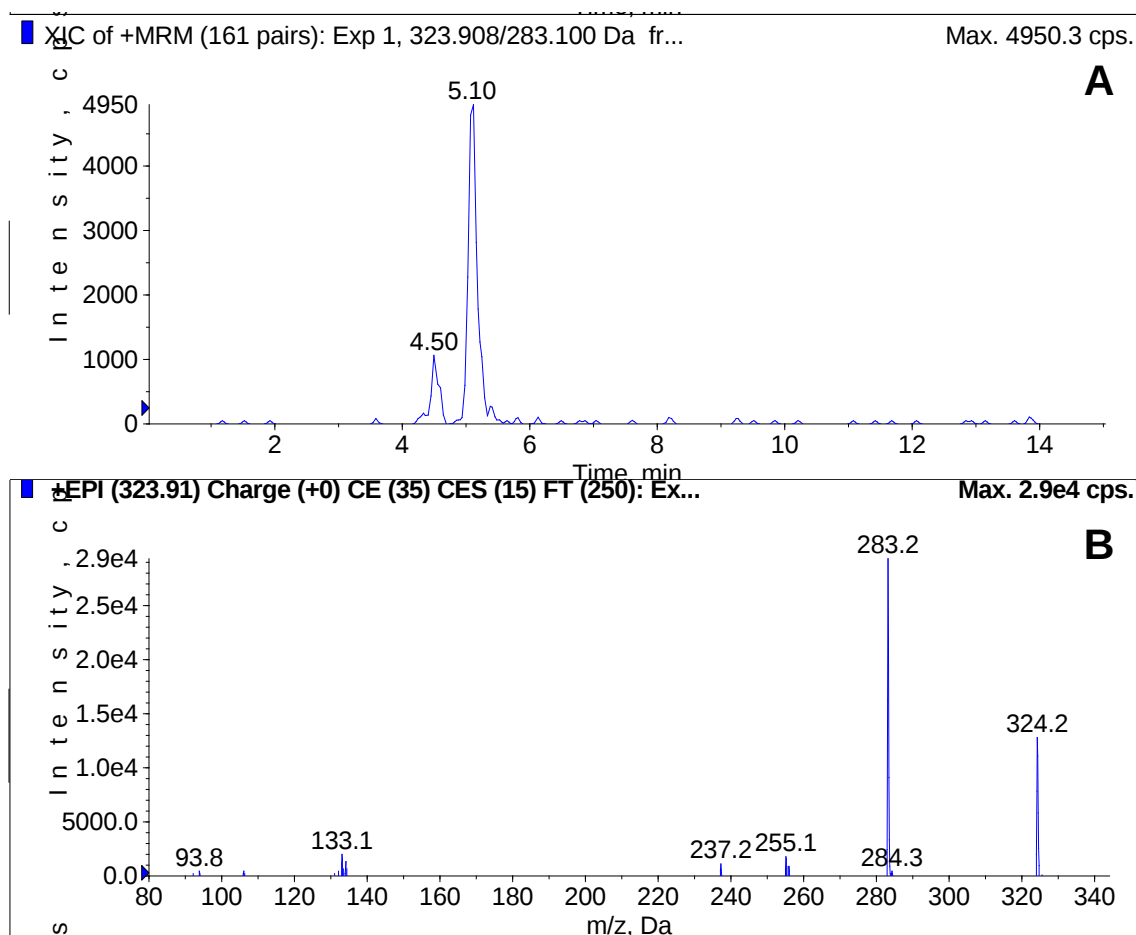
Figura 46 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 328, formado após a incubação de 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 78 com a enzima nitroreductase.



Fonte: autor do trabalho.

Analisando cuidadosamente a amostra de biotransformação, foi possível observar a presença de um outro pico cromatográfico a 5,10 min (Figura 51A) de m/z 324 ($[M + H]^+$) e a diferença de massa de 34 Da para o íon molecular indica a perda do cloreto, que está localizado no anel aromático. O possível produto foi confirmado pela análise de íons fragmento (EPI) de m/z 324, como mostra a Figura 47B.

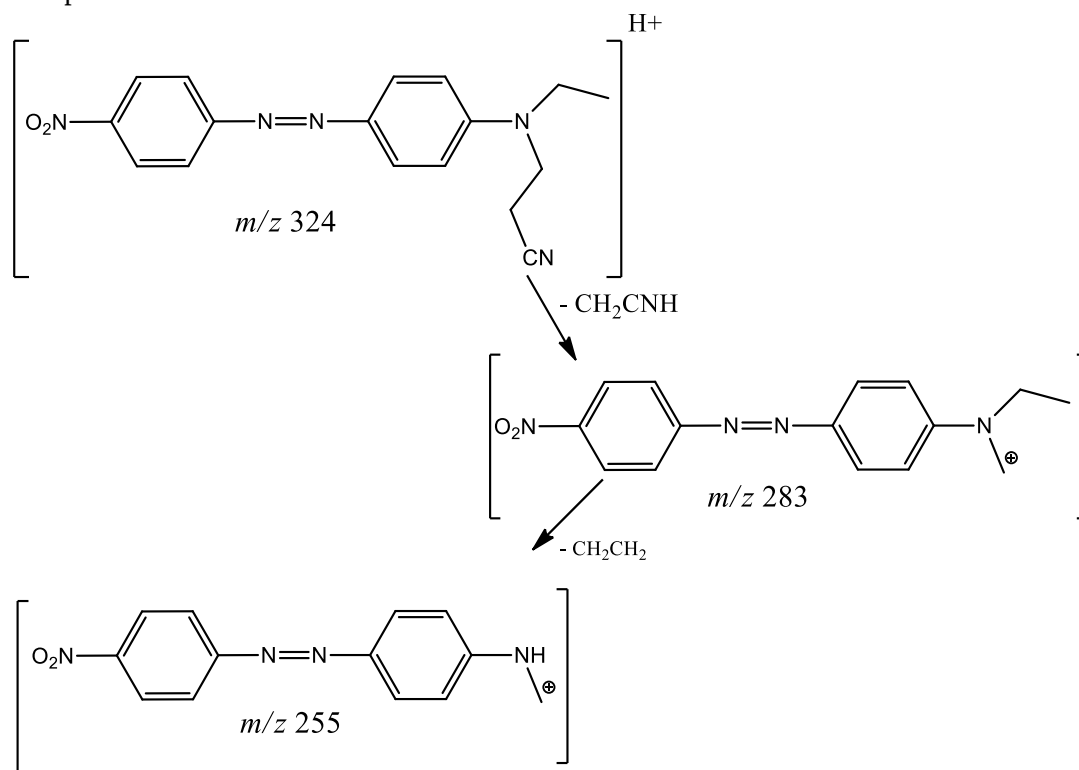
Figura 47 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 324 ($[M+H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 324.



Fonte: autor do trabalho.

A Figura 47B ilustra o espectro de massa de íons fragmento, o íon fragmento mais intenso m/z 283 (pico base) corresponde à perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 255, indicando a perda de um grupo etila. Portanto, este novo metabolito foi atribuído à 3-(ethyl(4-((4-nitrophenyl)diazenil)fenil)amino)propanenitrila como segundo produto formado após a biotransformação do corante DR 78. A proposta de fragmentação é mostrada na Figura 48.

Figura 48 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 324, formado após a incubação de 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 78 com a enzima nitroredutase.



Fonte: autor do trabalho.

Neste caso, tem-se dois metabólitos formados pela ação da nitroredutase, referente à redução do grupo nitro à amina e outro sem redução do grupo nitro, mas com perda do cloro ligado ao anel aromático. A Tabela 11, resume os principais produtos formados.

Tabela 11 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 78 com a enzima nitroredutase livre no meio reacional.

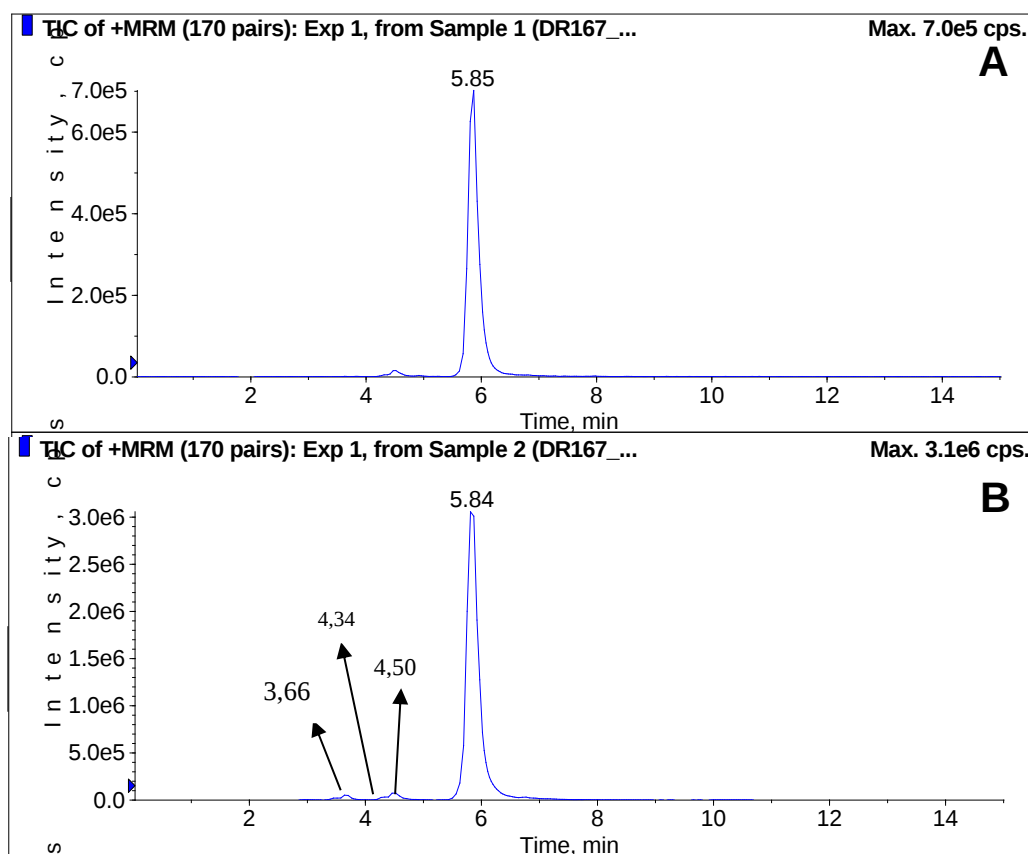
Tipo de reação	Metabólitos	Estrutura	m/z	Tempo de retenção (min)	Íons fragmento
Enzima livre no meio reacional	3-(((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil) (etil)amino)propanenitrila		328	3,78	287,2; 259,2; 126,0
	3-(ethyl(4-((4-nitrophenyl)diazenil)fenil) amino)propanenitrila		324	5,10	283,2; 255,1

Fonte: autor do trabalho.

4.8.1.2 Biotransformação do corante DR 167 pela ação da nitroreductase em solução

A Figura 49 apresentou o perfil cromatográfico (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 167 antes (A) e após (B) reação com a nitroreductase.

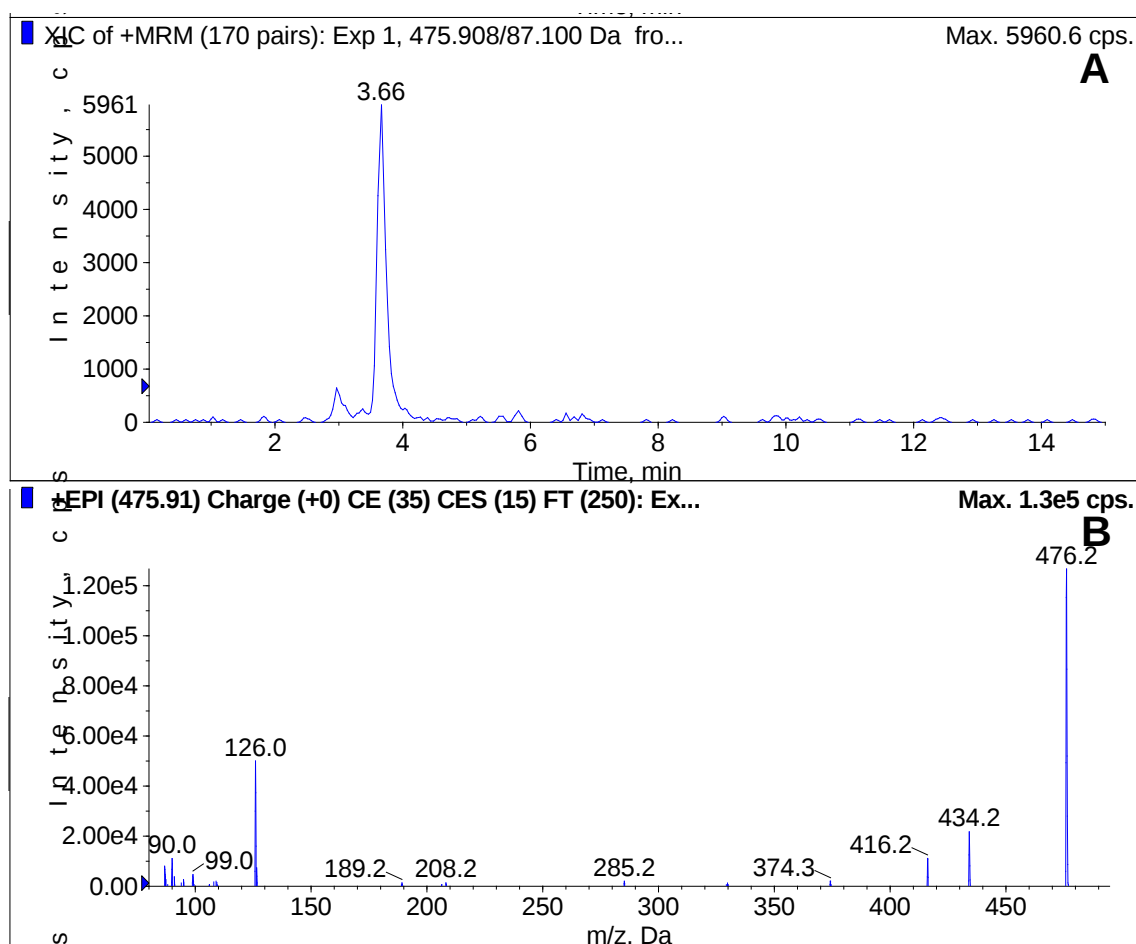
Figura 49 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante DR 167 A) antes da reação com nitroreductase (amostra diluída 2 vezes) e B) após reação com nitroreductase.



Fonte: autor do trabalho.

Através da comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras de controle e de biotransformação, pode-se observar um pico intenso em torno de 5,85 min, o qual corresponde ao corante padrão DR 167. Na amostra de biotransformação, Figura 49B, detectou-se um pico em t_r 3,66 min e m/z 476 ($[M + H]^+$), dois outros em t_r 4,34 minutos e 4,50 min, respectivamente. A Figura 50 mostra o cromatograma de íon extraído para t_r 3,66 min.

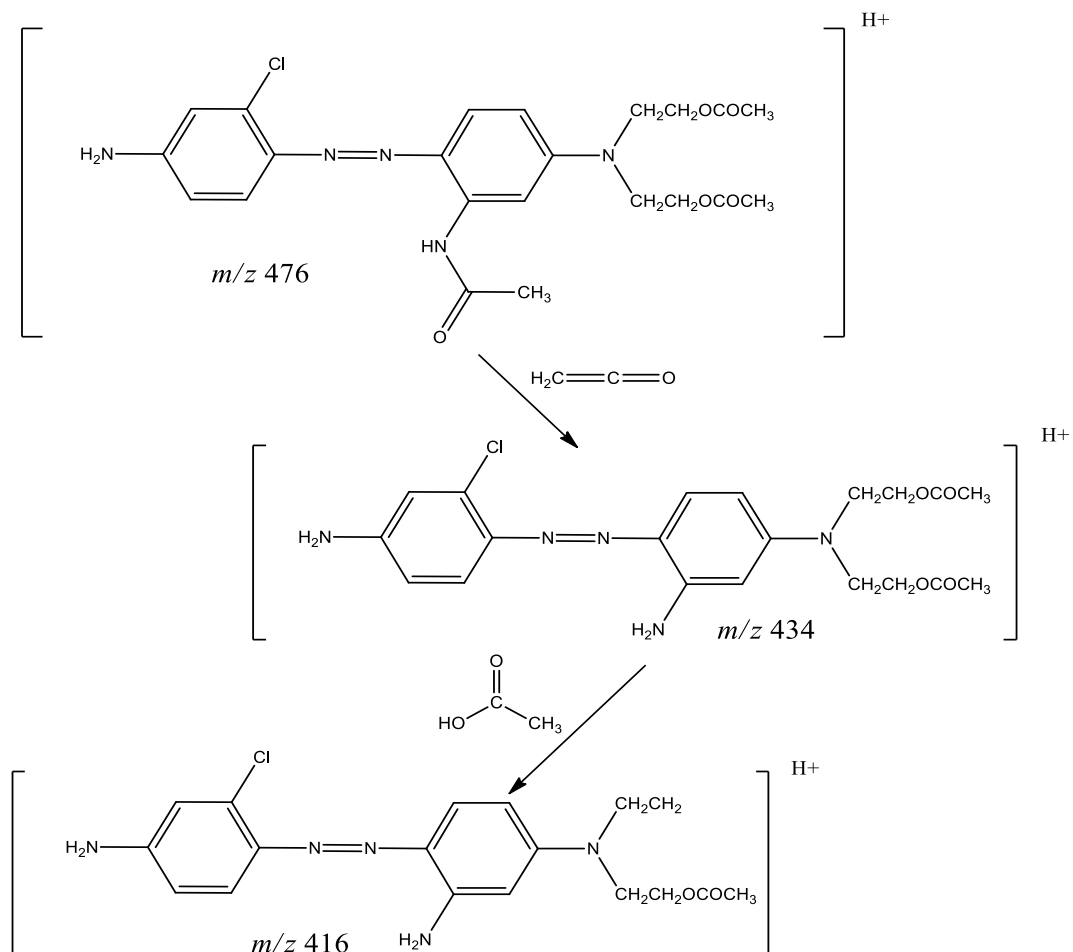
Figura 50 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 476 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 476.



Fonte: autor do trabalho.

A análise deste pico mostra que a massa 475 Da corresponde ao íon de m/z 476 ($[M + H]^+$) e indicou a redução do grupo nitro. Análise de íons fragmento (EPI) do íon m/z 476 confirmou a presença de um novo metabólito (Figura 50B). O espectro de massas (fragmentos de EPI) revelou como íon fragmento m/z 434, um composto em que houve a perda de um acetaldeído (42 Da). Um outro íon fragmento observado m/z 416 indica a perda de um ácido acético (60 Da). Portanto, este novo metabólito foi atribuído à ((3-acetamido-4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)azanedil)bis(etano-2,1-diil) diacetato como o produto principal após a biotransformação do corante DR 167. Uma proposta de fragmentação foi descrita para os experimentos de LC-MS/MS, como mostra a Figura 51.

Figura 51 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 476, formado após a incubação de 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 167 com a enzima nitroreductase.

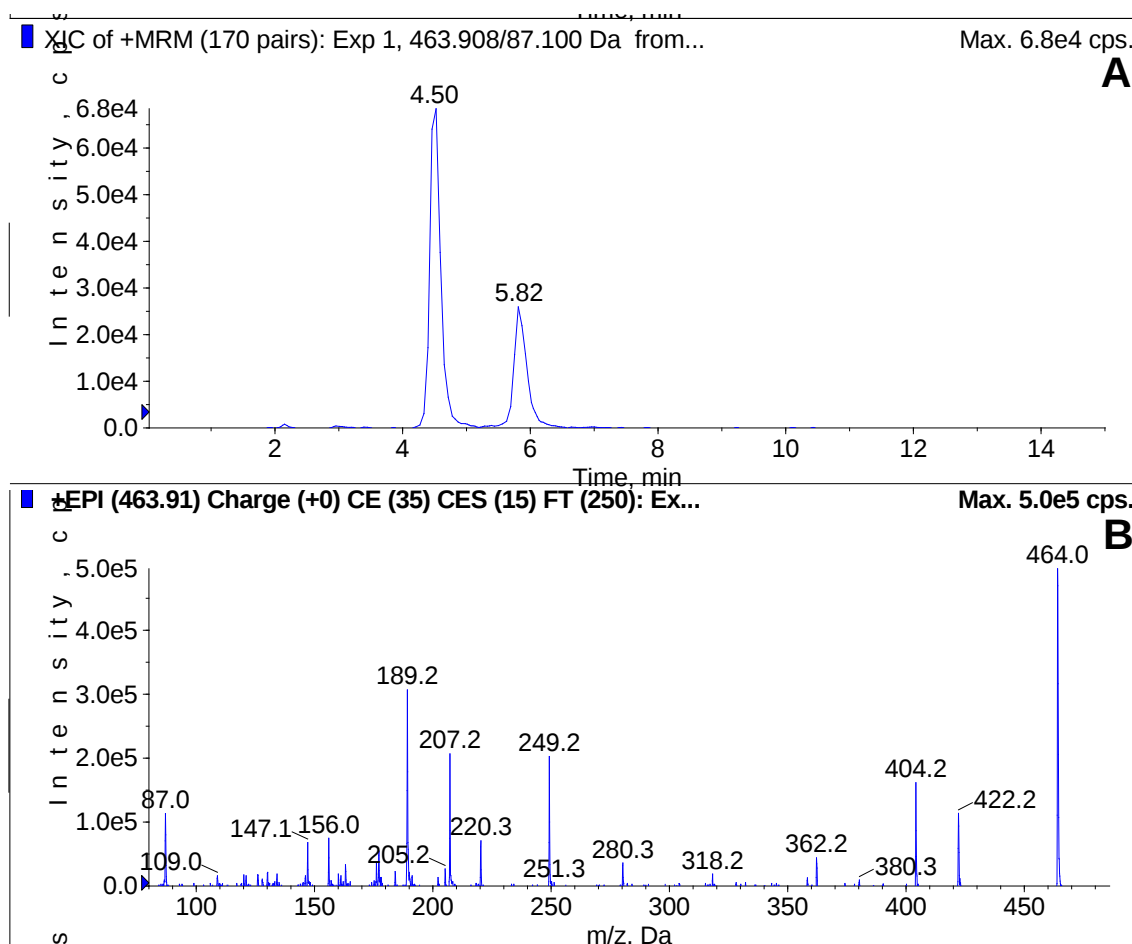


Fonte: autor do trabalho.

Estes resultados mostram que o corante DR 167 é metabolizado pela enzima nitroreductase, localizada na microflora intestinal, e a produção de um metabólito principal de m/z 476, que ocorre através da redução do grupo nitro do corante.

Analisando cuidadosamente a amostra de biotransformação, foi possível observar a presença de mais dois picos cromatográficos; um a 4,50 min (Figura 52A) de m/z 464 ($[M + H]^+$) e outro a 4,34 min (Figura 54A) de m/z 472 ($[M + H]^+$).

Figura 52 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 464 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 464.

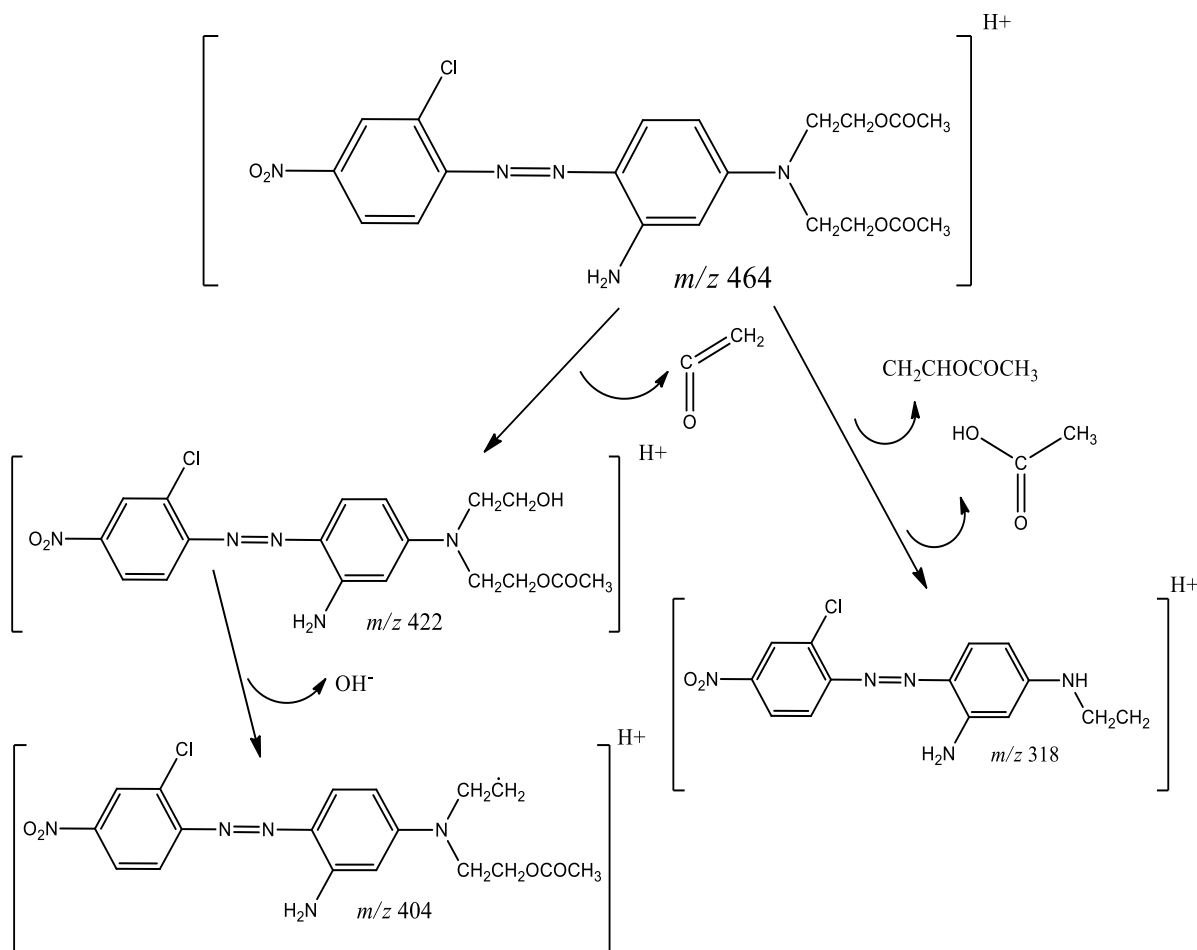


Fonte: autor do trabalho.

A Figura 52A mostra o cromatograma de íons extraídos para o possível metabólito de m/z 464. A confirmação do metabólito foi realizada pela análise de íons fragmento (EPI) de m/z 464, como mostra a Figura 52B, que ilustra o espectro de massa de íons fragmento, o íon fragmento m/z 422 corresponde à perda de um radical (42 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 404, indicando a perda de um grupo hidroxila (17 Da). O íon de m/z 318 equivale a uma perda de 146 Da, a qual corresponde a um dos grupo volumosos da amina dissubstituída ($C_2H_4OCOCH_3$) e mais um acetato. O nome atribuído a este metabólito foi ((3-amino-4-((2-cloro-4-nitrofenil)diazenil)fenil)azanediil)bis(etano-2,1-diil) diacetato como segundo produto formado após a biotransformação do corante DR 167.

A proposta fragmentação para os experimentos de LC-MS/MS é mostrada na Figura 53.

Figura 53 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 464, formado após a incubação de 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 167 com a enzima nitroreductase.

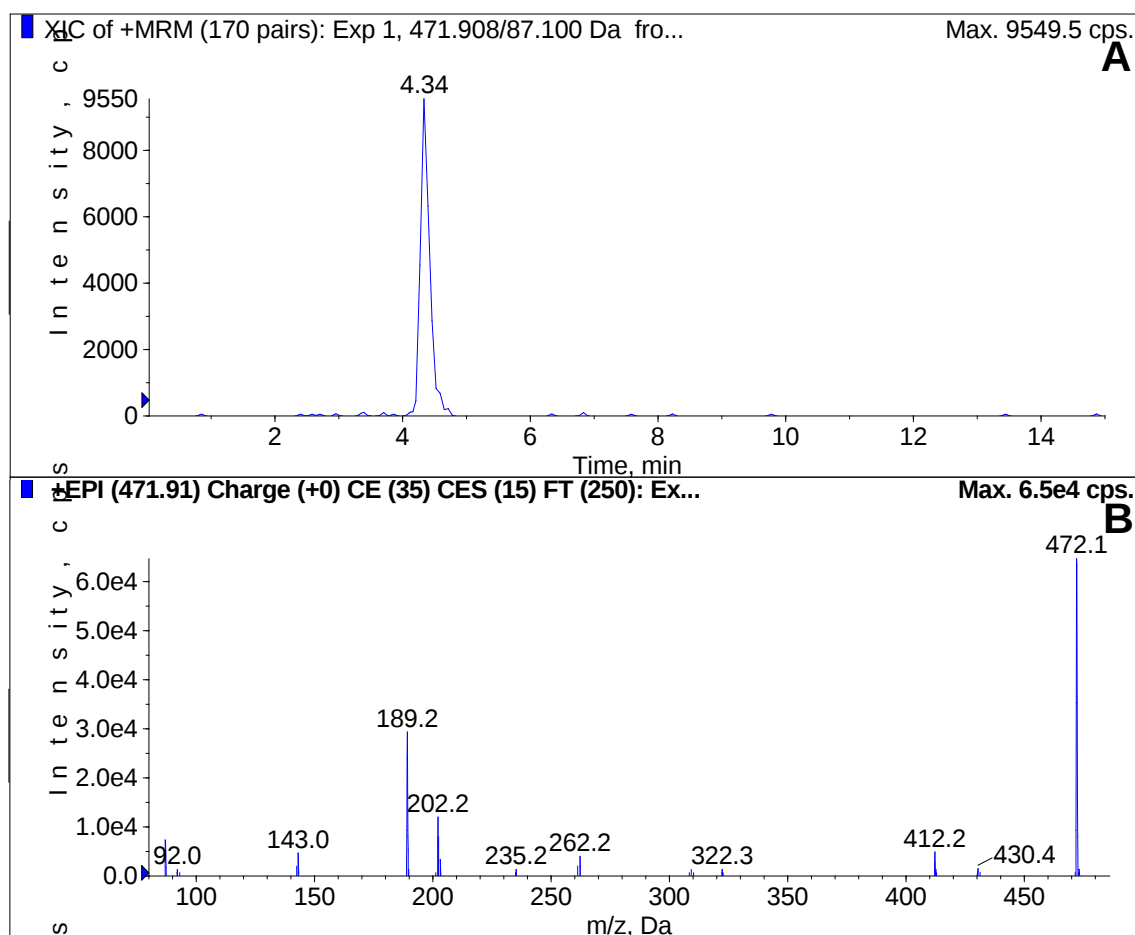


Fonte: autor do trabalho.

O segundo metabólito analisado, m/z 472, foi originado através da perda da carboxila do grupo amida do corante. Neste caso, a nitroreductase não atuou no grupo nitro, mas na função amida.

O último metabólito formado durante biotransformação do corante DR 167 pela enzima nitroreductase livre no meio reacional foi o de m/z 472, $t_r = 4,34$ min, como indica a Figura 54.

Figura 54 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 472 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroreductase. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 472.

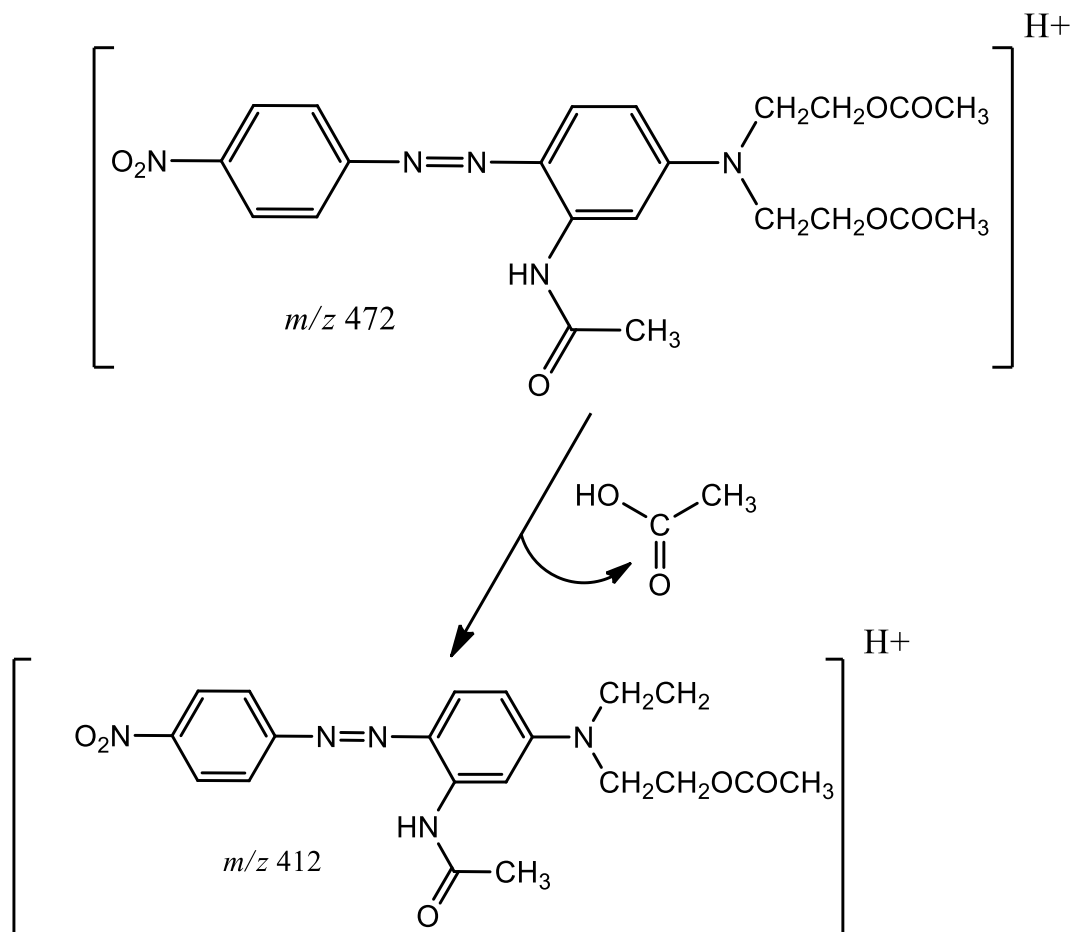


Fonte: autor do trabalho.

A Figura 54A mostra o cromatograma de íons extraídos para o possível metabólito de m/z 472. A confirmação do metabólito foi realizada pela análise de íons fragmento (EPI) de m/z 472, como mostra a Figura 54B, que ilustra o espectro de massa de íons fragmento, onde o íon fragmento m/z 412 corresponde à perda de um ácido acético (60 Da). O nome atribuído a este metabólito foi ((3-acetamido-4-((4-nitrofenil)diazenil)fenil)azanedil)bis(etano-2,1-diil) diacetato como terceiro produto formado após a biotransformação do corante DR 167.

A Figura 55 ilustra a proposta fragmentação para os experimentos de LC-MS/MS.

Figura 55 - Fragmentação proposta para o metabólito m/z 472, formado após a incubação de 20 mg L⁻¹ do corante padrão DR 167 com a enzima nitroreductase.



Fonte: autor do trabalho.

O terceiro metabólito analisado, m/z 472, foi originado através da perda do cloro ligado ao anel aromático ligado ao grupo azo corante. Esse resultado comprova que a enzima nitroreductase não necessariamente, neste caso, atua somente no grupo nitro da molécula.

As análises das amostras contendo corante DR 167 e nitroreductase indicaram a presença de três produtos de biotransformação. O produto de m/z 476 foi resultado da redução do grupo nitro e os outros dois produtos obtidos não atuaram no grupo nitro da molécula, comprovando que a enzima atuou em mais de um sítio específico da mesma.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 167 são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 167 com a enzima nitroredutase livre no meio reacional.

Tipo de reação	Metabólitos	Estrutura	m/z	Tempo de retenção	Íons fragmento
Enzima livre no meio reacional	((3-acetamido-4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)azanedil) bis(etano-2,1-diil) diacetato		476	3,66	434,2; 416,2
	((3-amino-4-((2-cloro-4-nitrofenil)diazenil)fenil)azanedil) bis(etano-2,1-diil) diacetato		464	4,50	422,2; 402,2; 318,2
	((3-acetamido-4-((4-nitrofenil)diazenil)fenil)azanedil) bis(etano-2,1-diil) diacetato		472	4,34	412,2

Fonte: autor do trabalho.

Apesar da enzima nitroredutase ter atuado no grupo nitro, através da redução do NO_2 à NH_2 , em todos os corantes estudados neste trabalho, observa-se pouca formação do produto de biotransformação.

O corante DR 73 mostrou como produto majoritário, após a reação enzimática, o íon de m/z 319, 2-(2-(4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)hidrazinil)-5-nitrobenzonitrila, porém, através dos espectros de LC-MS/MS, observou-se a formação de pouca quantidade desse metabólito no meio reacional, indicando que a enzima não atuou efetivamente no grupo nitro da molécula do corante DR 73. Após a reação enzimática, dois metabólitos foram formados para o corante DR 78 e três metabólitos para o corante DR 167, indicando que a enzima atuou em mais de um sítio ativo da molécula e não somente no grupo nitro, o que explica os baixos valores formados de cada metabólito.

A seguir, com o objetivo de diminuir o tempo de extração dos corantes sujeitos a enzima nitroredutase em solução e conseguir maior índice de redução do corante, bem como minimizar a quantidade de enzima usada nos testes, todos os testes de biotransformação para

os corantes DR 73, DR 78 e DR 167 foram refeitos immobilizando a enzima em nanopartículas magnéticas de magnetita modificada com grupos tosil.

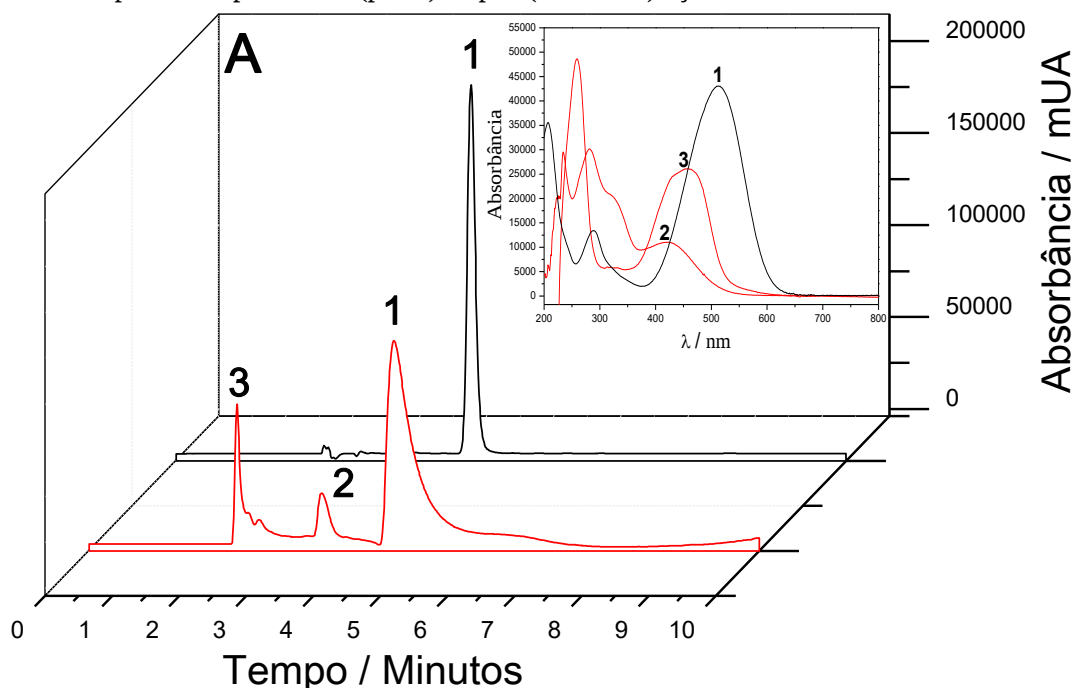
4.8.2 Imobilização da enzima nitroreductase

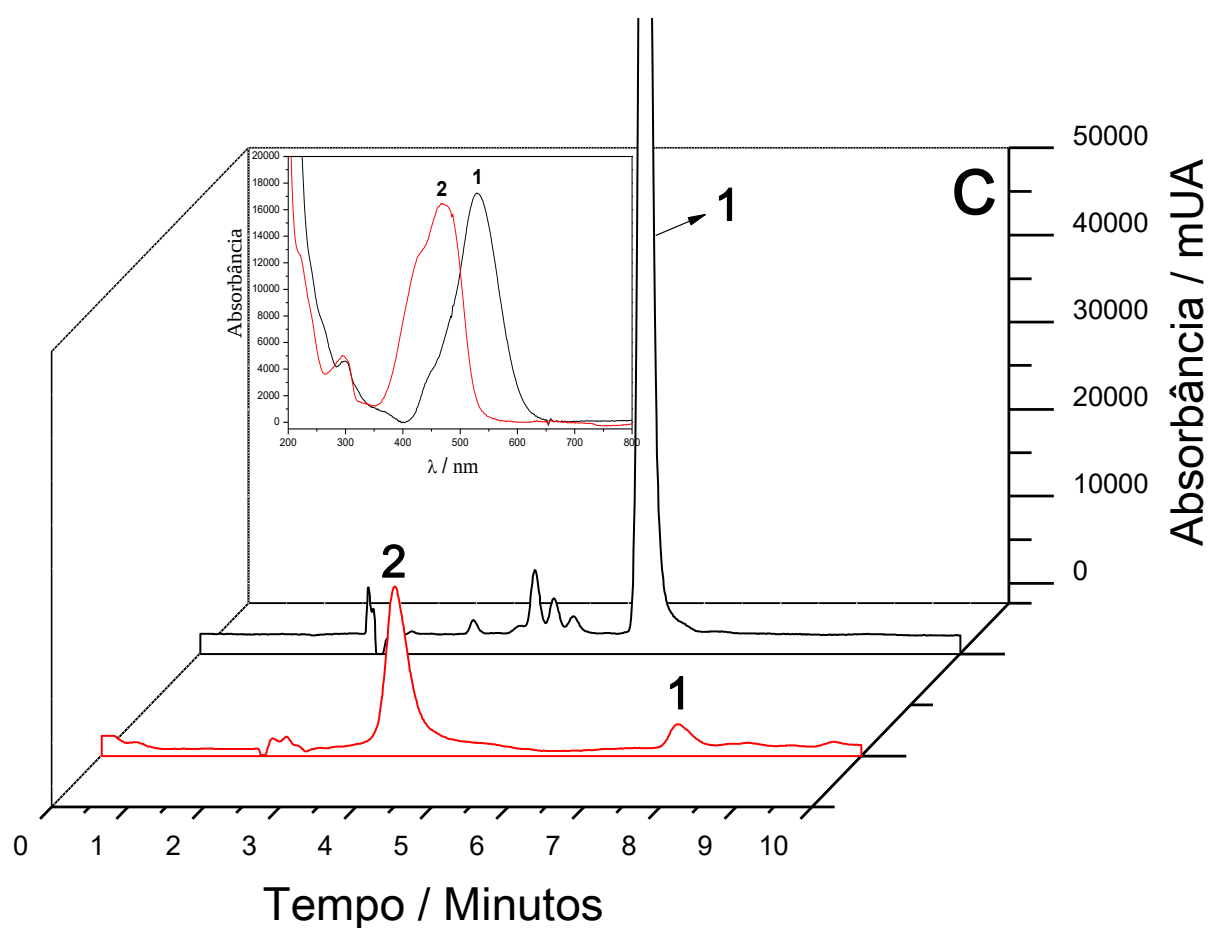
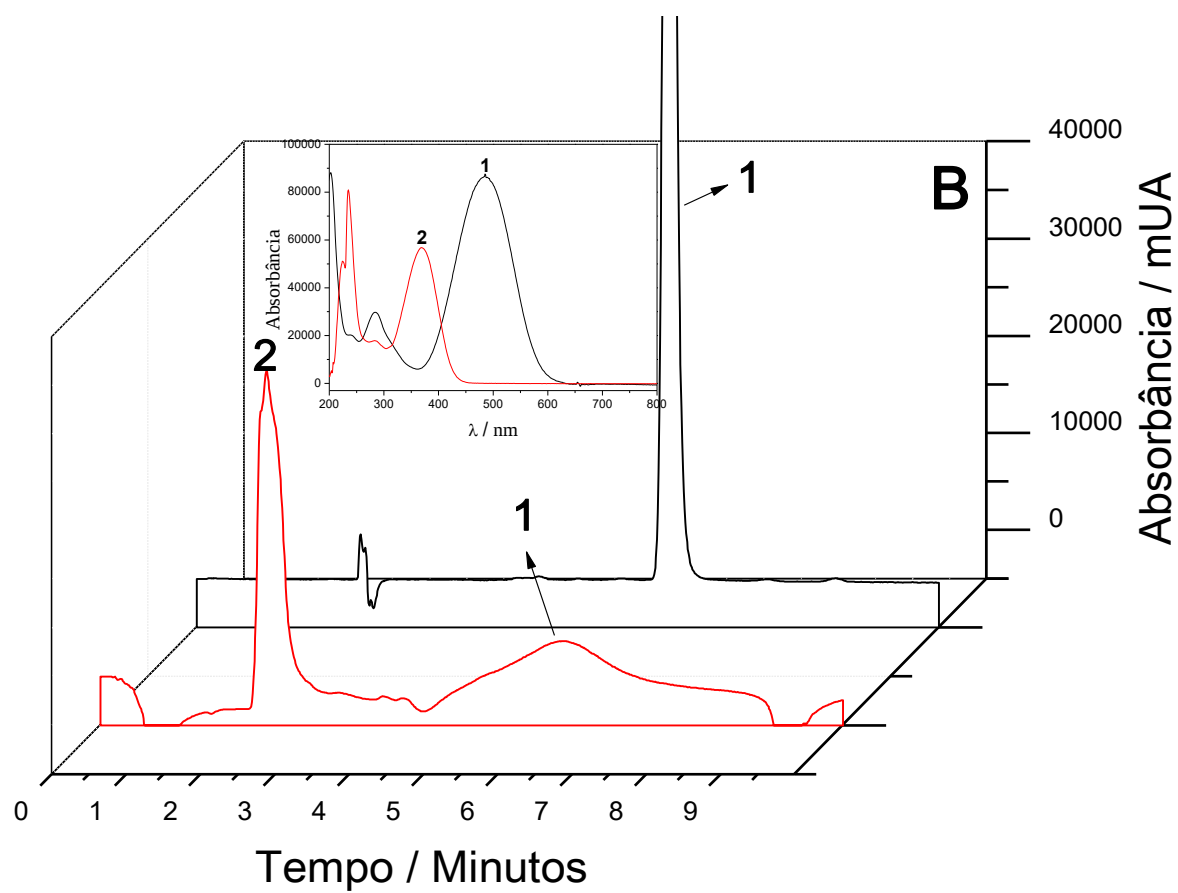
Após imobilização da enzima nitroreductase nas partículas magnéticas de Fe_2O_3 -tosila, como descrito na seção 3.5., realizou-se o Teste de Bradford para determinar a porcentagem de enzima imobilizada, que neste caso, foi de 91,4%. As condições experimentais para a reação enzimática de corantes têxteis foram: 20 μL de corante têxtil (20 mg L^{-1}), 50 μL de enzima nitroreductase imobilizada com de partículas magnéticas de Fe_2O_3 modificadas com grupo tosil (2 mg mL^{-1}), 20 μL de NADPH (10 mmol L^{-1}) e e 310 μL de tampão de fosfato (pH 7,0) em um volume final de 400 μL . As soluções foram aquecidas a 90°C , a 700 rpm por 60 min

4.8.3 Análise dos produtos de DR 73, DR 78 e DR 167 submetidos à reação com nitroreductase imobilizada por CLAE-DAD

A Figura 56 (Curvas A-C) mostra os cromatogramas CLAE-DAD obtidos para 20 mg L^{-1} dos corantes (A) DR 73, (B) DR 78 e (C) DR 167 nas seguintes condições: coluna C18, fase móvel = ACN/ H_2O 80 : 20 (v/v), vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $T = 30^\circ\text{C}$, antes e após submetê-los à ação enzimática da nitroreductase imobilizada.

Figura 56 - Cromatogramas de CLAE-DAD registrados para 20 mg L^{-1} dos corantes Disperse Red 73 (A), Disperse Red 78 (B) e Disperse Red 167 (C) em acetonitrila obtida através da coluna C-18, fase móvel 80:20 ACN / H_2O . vazão = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. $T = 30^\circ\text{C}$. Detecção: $\lambda = 510 \text{ nm}$; 488 nm e 512 nm , para Disperse Red 73, Disperse Red 78 e Disperse Red 167, respectivamente. Inserte: Espectros de UV-Vis obtidos para cada pico antes (preto) e após (vermelho) ação enzimática.





Fonte: autor do trabalho.

Os resultados dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para os corantes DR 73, DR 78 e DR 167 após reação com a enzima nitroredutase imobilizada foram bem semelhantes aos resultados com a enzima livre no meio reacional.

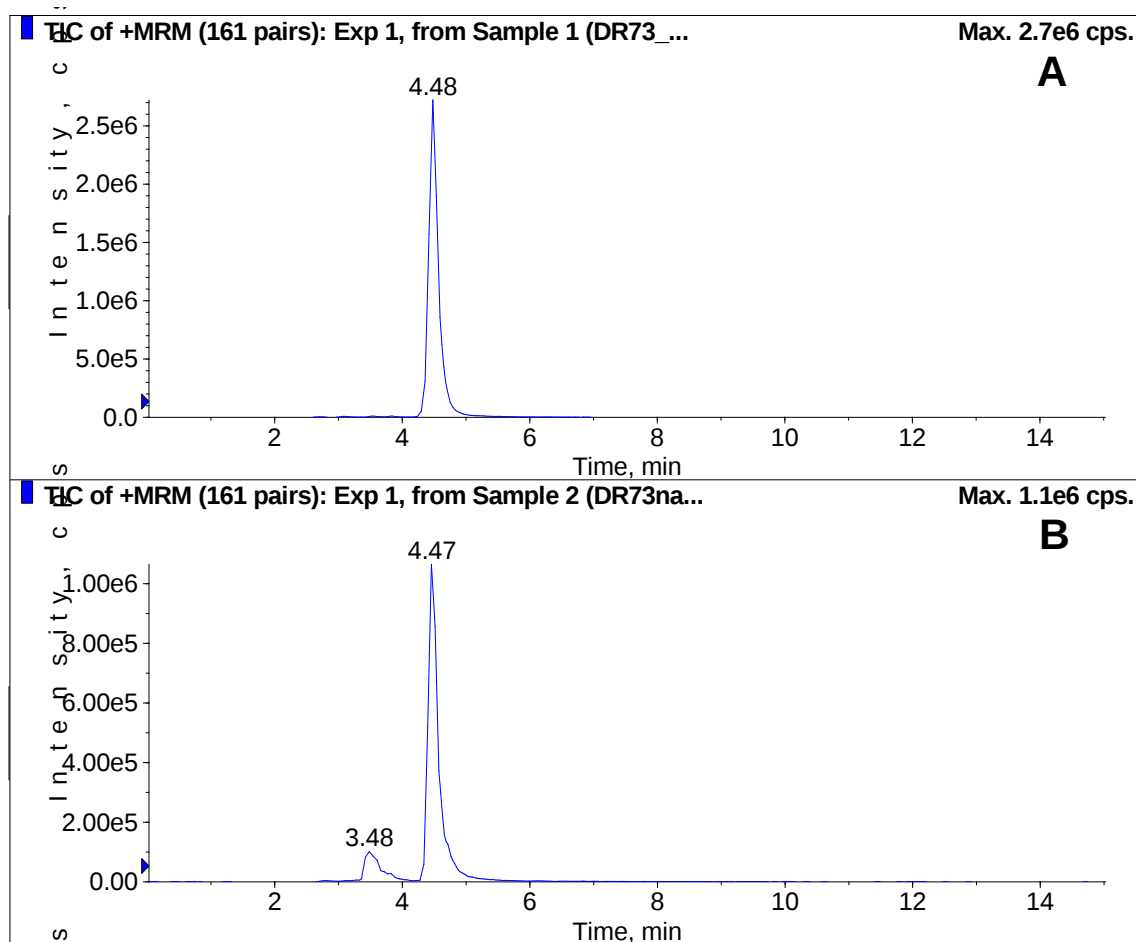
Picos cromatográficos (1) bem definidos foram obtidos para os corantes DR 73, DR 78 e DR 167 antes da reação enzimática em tempos de retenção de 4,42; 6,36 e 5,85 minutos, respectivamente. Após a reação com a enzima nitroredutase imobilizada, observou-se novos picos cromatográficos em tempos de retenção de 2,13 (pico 2) e 3,90 (pico 2) minutos, para os corantes DR 78 e DR 167, respectivamente. Observou-se o surgimento de dois picos cromatográficos para o corante DR 73, após a reação enzimática, nos tempos de retenção de 2,22 e 3,50 min. Os picos cromatográficos (1) que aparecem para os corantes DR 73 ($t_r = 4,55$), DR 78 ($t_r = 6,26$ min) e DR 167 ($t_r = 7,34$), após reação enzimática (em vermelho), são atribuídos à resíduos do corante, indicando que não houve total degradação dos mesmos. A porcentagem de degradação do corantes foram de 50%, 97,6% e 98,8% para os corantes DR 73, DR 78 e DR 167, respectivamente, após reação com a nitroredutase.

A seguir, investigou-se os possíveis produtos pela técnica de LC-MS/MS. Inicialmente, espectros no modo full scan foram registrados com o intuito de detectar qualquer metabólito através da aquisição de dados entre m/z 200 a m/z 800. A identificação de potenciais metabólitos foram realizados por comparação dos cromatogramas de íons totais e espectros de massa obtidos para as amostras correspondente ao controle e biotransformação. Íons alvo detectados, que não estavam presentes nas amostras de controle foram considerados como potenciais metabólitos.

4.8.3.1 Ação da enzima nitroredutase imobilizada sobre o corante DR 73

A Figura 57 apresenta o perfil cromatográfico (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 73 na ausência da enzima imobilizada (A) e após (B) reação com a nitroredutase imobilizada.

Figura 57 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 g L^{-1} do corante DR 73 A) antes da reação com nitroreductase imobilizada (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroreductase imobilizada.

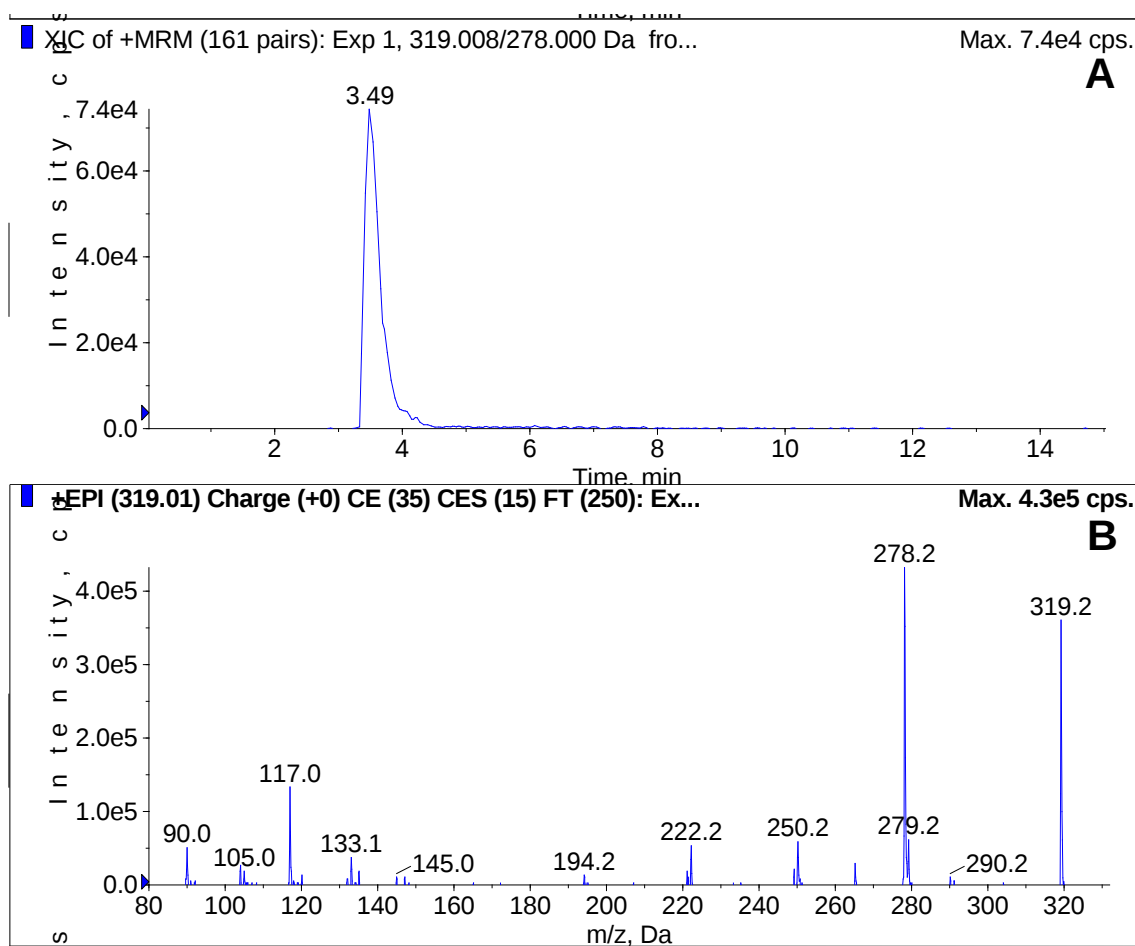


Fonte: autor do trabalho.

Observa-se que ambos os cromatogramas apresentaram uma banda em torno de 4,45 min, referente ao corante padrão DR 73. Na Figura 57B, pode-se observar um outro pico cromatográfico em $t_r = 3,48$ min, indicando um possível produto de biotransformação do corante DR 73 após reação com a enzima imobilizada.

A Figura 58 ilustra o XIC e o espectro de massas para o pico de $t_r = 3,49$ min, m/z 319 para o DR 73 após reação com a enzima nitroreductase.

Figura 58 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 319 ($[M+H]^+$) para o corante DR 73 após biotransformação com a nitroreductase imobilizada. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 319.

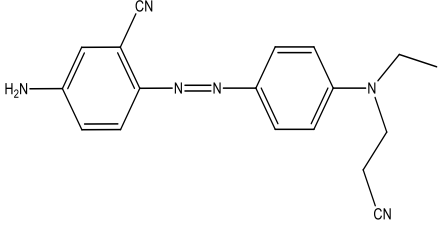


Fonte: autor do trabalho.

O espectro de massas MS/MS mostrou como principal íon fragmento m/z 278, que corresponde à perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 222, indicando a perda da amina dissubstituída, a qual estava ligada ao anel aromático. Portanto, este novo metabólito foi atribuído à 2-(2-(4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)hidrazinil)-5-nitrobenzonitrila como o produto principal após a biotransformação do corante DR 73. A proposta de fragmentação é a mesma apresentada na Figura 43.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 73 são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 73 com a enzima nitroredutase imobilizada.

Tipo de reação	Metabólitos	Estrutura	<i>m/z</i>	Tempo de retenção (min)	Íons fragmento
Enzima imobilizada	2-(2-(4-((2-cianoetil) (etil)amino)fenil) hidrazinil)-5-nitrobenzonitrila		319	3,49	278,3; 222,2

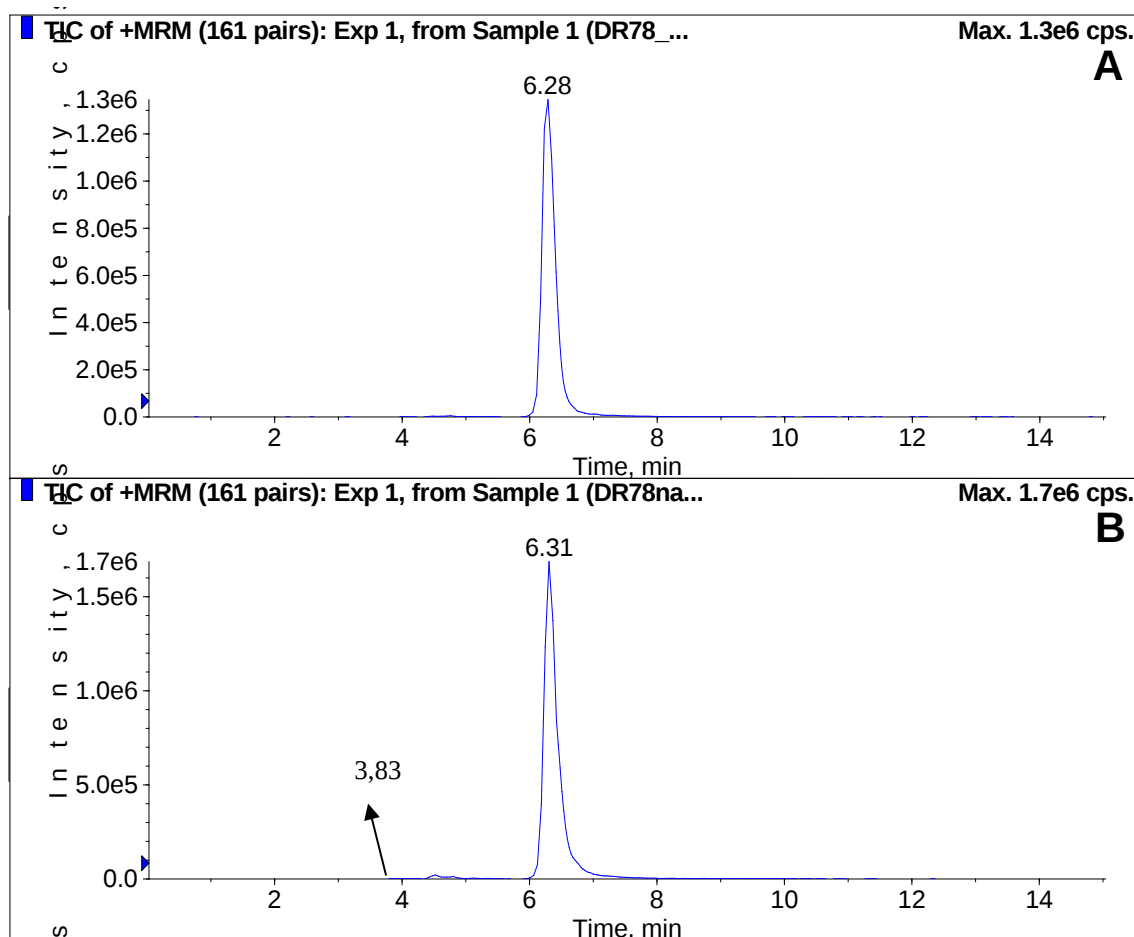
Fonte: autor do trabalho.

Através dos resultados apresentados para o corante DR 73, observa-se que para ambas as amostras do corante tratadas com a enzima livre ou imobilizada, o metabólito formado foi o mesmo, *m/z* 319, o qual foi obtido pela redução do grupo NO₂ para NH₂, pela ação da nitroredutase. O valor da área do pico cromatográfico (XIC) referente ao íon *m/z* 319 da amostra contendo a enzima imobilizada (Fig. 58A) foi superior aos valores encontrados para a enzima livre no meio reacional (Fig. 42A), ou seja, houve maior formação do metabólito quando se imobilizou a enzima, possibilitando que a reação de biotransformação ocorresse de forma mais efetiva.

4.8.3.2 Ação da enzima nitroredutase imobilizada sobre o corante DR 78

A Figura 59 mostra o perfil cromatográfico (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 78 na ausência da enzima imobilizada (A) e após (B) reação com a nitroredutase imobilizada.

Figura 59 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L⁻¹ do corante DR 78 A) antes da reação com nitroreductase imobilizada (amostra diluída duas vezes) e B) após reação com nitroreductase imobilizada.

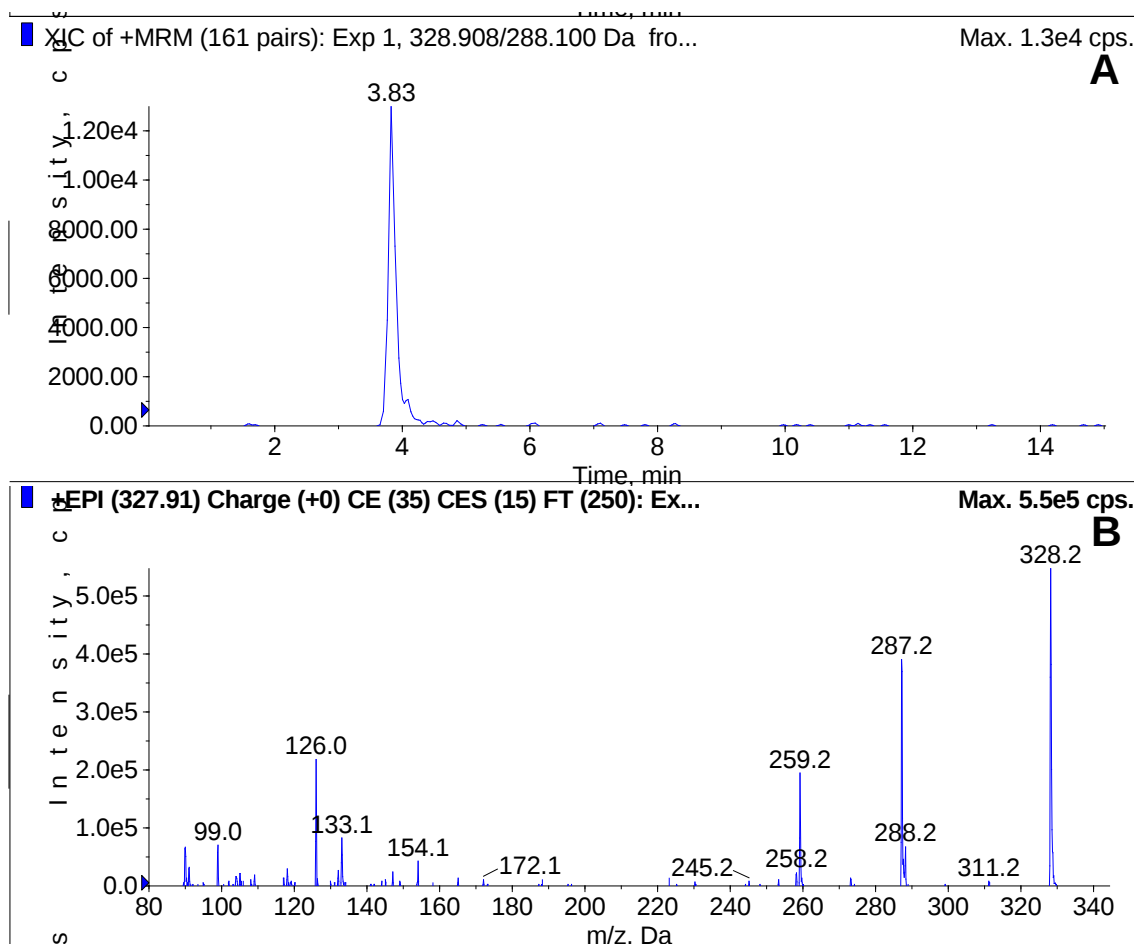


Fonte: autor do trabalho.

Observa-se que as Figuras 59A e 59B apresentaram um pico em torno de 6,28 min, referente ao corante padrão DR 78. Ao analisar cautelosamente a Figura 59B, observa-se um pico cromatográfico referente ao $t_r = 3,83$ min, indicando um possível produto de biotransformação do corante DR 78 após reação com a enzima imobilizada.

A Figura 60 mostra o XIC e o espectro de massas para o pico de $t_r = 3,83$ min, m/z 328, para o DR 78 após reação com a enzima nitroreductase.

Figura 60 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 328 ($[M+H]^+$) para o corante DR 78 após biotransformação com a nitroreductase imobilizada. B) Espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 328.

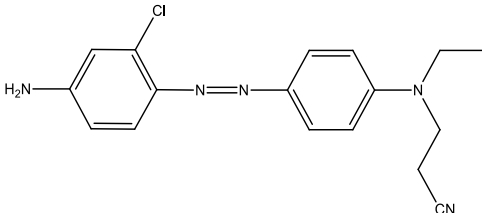


Fonte: autor do trabalho.

O íon de m/z 328 indica a presença do único metabólito formado na reação do corante DR 78 com a enzima nitroreductase imobilizada, a diferença de massa de 30 Da para o íon molecular indica uma redução no grupo nitro, ($-\text{NO}_2$) a NH_2 . A Figura 60B ilustra o espectro de massa de íons fragmento. O íon fragmento de m/z 287 corresponde à perda de um cianeto de metila (41 Da). Um outro íon fragmento foi observado m/z 259, indicando a perda de um grupo etila. Além disso, o íon m/z 126 foi também observado e está correlacionado com a clivagem da ligação entre a amina do grupo azo com o anel aromático que contém o cloro e o grupo NH_2 reduzido. Portanto, este novo metabólito foi atribuído à 3-((4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)(etil)amino)propanenitrila como o produto formado após a biotransformação do corante DR 78 (Figura 46).

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 78 são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 78 com a enzima nitroredutase.

Tipo de reação	Metabólitos	Estrutura	<i>m/z</i>	Tempo de retenção (min)	Íons fragmento
Enzima imobilizada	3-((4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)(etil)amino)propanenitrila		328	3,83	278,3; 222,2

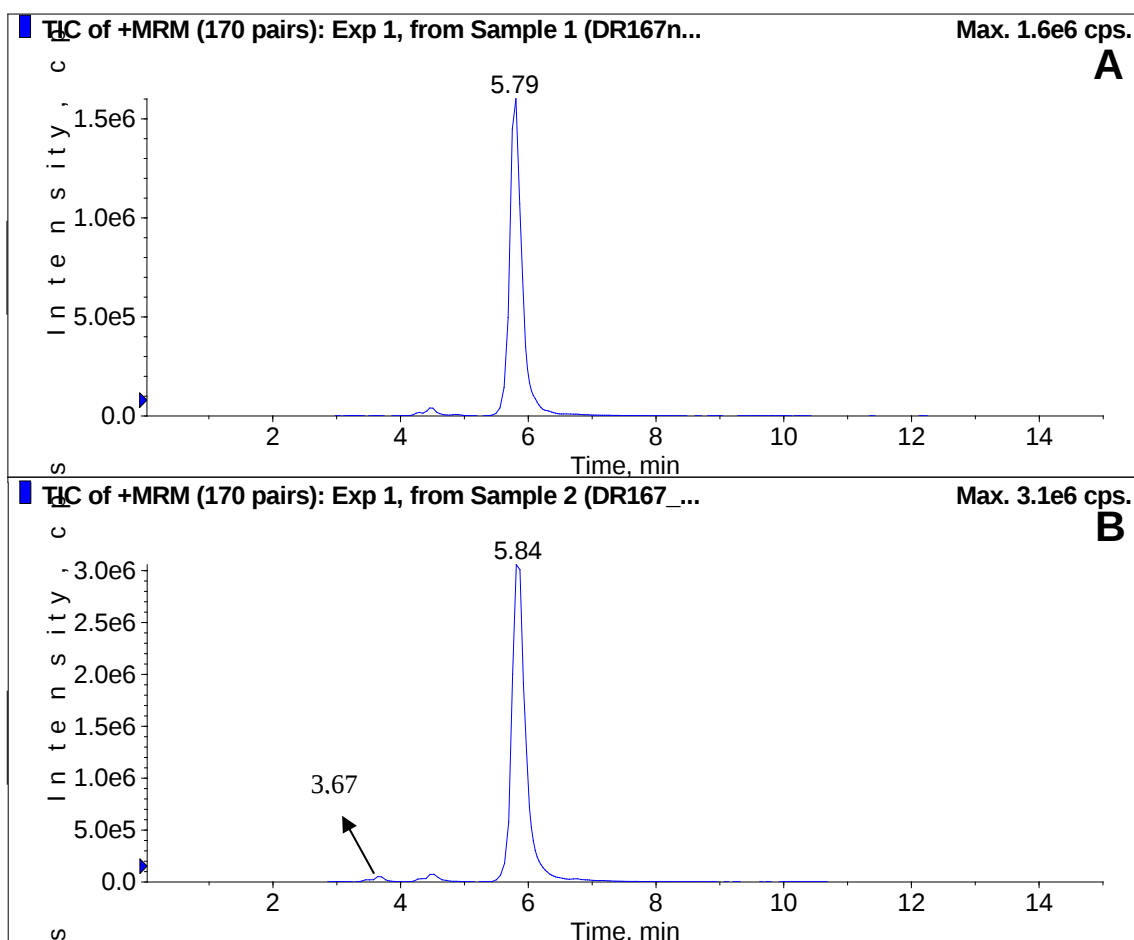
Fonte: autor do trabalho.

Através dos resultados apresentados para o corante DR 78, observa-se que para ambas as amostras do corante tratadas com a enzima livre ou imobilizada, o metabólito formado foi o mesmo, *m/z* 328, o qual foi obtido pela redução do grupo NO₂ para NH₂, pela ação da nitroredutase. O valor da área do pico cromatográfico (XIC) referente ao íon *m/z* 328 da amostra contendo a enzima imobilizada (Fig. 60A) foi superior aos valores encontrados para a enzima livre no meio reacional (Fig. 45A), ou seja, houve maior formação do metabólito quando se imobilizou a enzima, possibilitando que a reação de biotransformação ocorresse de forma mais efetiva.

4.8.3.3 Ação da enzima nitroredutase imobilizada sobre o corante DR 167

A Figura 61 apresentou o perfil cromatográfico (TIC) obtido por LC-MS para o corante DR 167 na ausência da enzima imobilizada (A) e após (B) reação com a nitroredutase imobilizada.

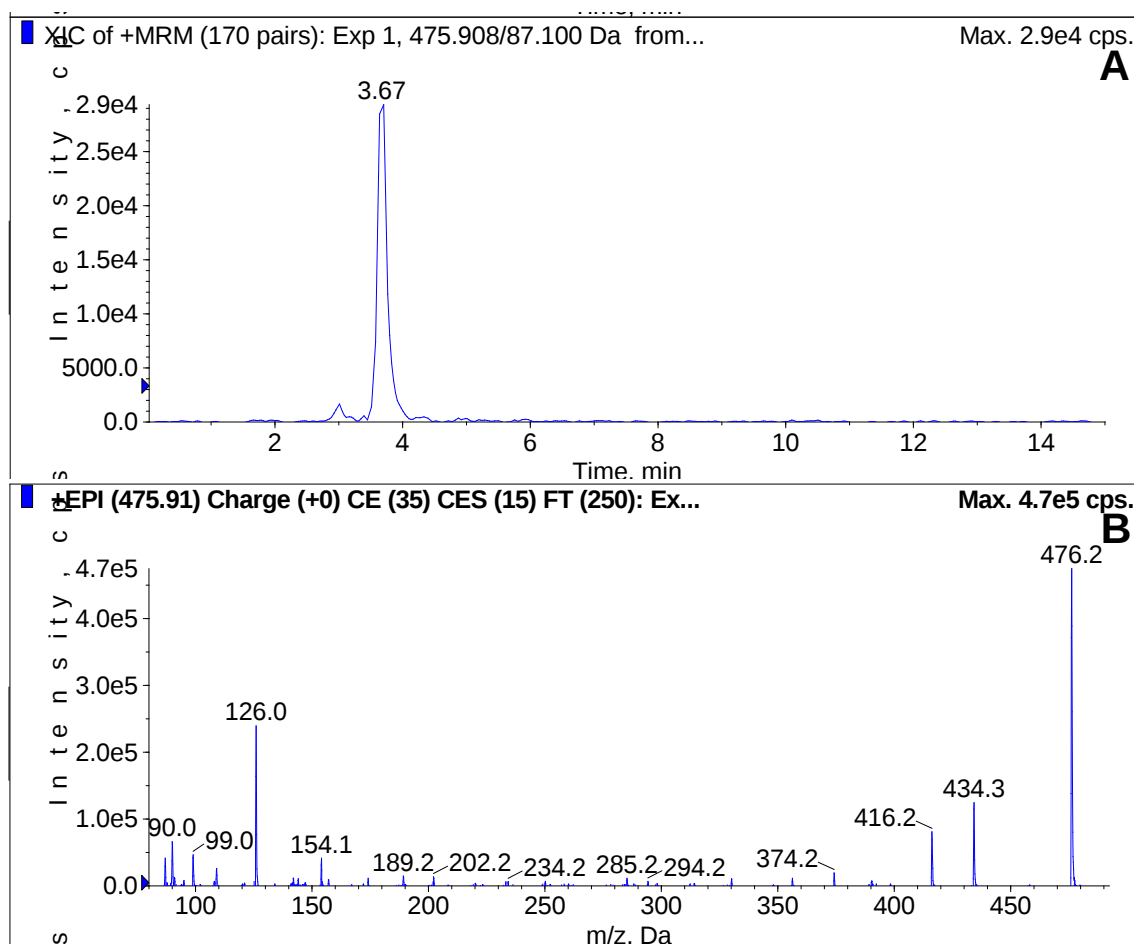
Figura 61 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido para soluções de 20 mg L^{-1} do corante DR 167 A) antes da reação com nitroredutase imobilizada (amostra diluída duas vezes) B) após reação com nitroredutase imobilizada.



Fonte: autor do trabalho.

Observa-se que as Figuras 61A e 61B apresentaram um pico em torno de 5,79 min, referente ao corante padrão DR 167. Ao analisar cautelosamente a Figura 61B, observa-se um pico cromatográfico referente ao $t_r = 3,67$ min, indicando um possível produto de biotransformação do corante DR 167 após reação com a enzima imobilizada. Um potencial metabólito com m/z 476 ($[M + H]^+$) foi observado em 3,67 minutos como mostra a Figura 62.

Figura 62 - A) Cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 476 ($[M+H]^+$) para o corante DR 167 após biotransformação com a nitroreductase imobilizada. B) espectro de massas MS/MS (cromatograma de íon fragmento) do produto formado, m/z 476.



Fonte: autor do trabalho.

A massa 475 Da corresponde ao íon de m/z 476 ($[M + H]^+$) e indicou a redução do grupo nitro. Análise de íons fragmento (EPI) do íon m/z 476, Figura 62B, confirmou a presença de um novo metabólito. O espectro de massas, fragmentos de (EPI), revelou como íon fragmento m/z 434, que corresponde à perda de um acetaldeído (42 Da). Um outro íon fragmento foi observado, m/z 416, indicando a perda de um ácido acético (60 Da). Portanto, este novo metabólito foi atribuído à ((3-acetamido-4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)azanedil)bis(etano-2,1-diil) diacetato como o produto principal após a biotransformação do corante DR 167 (Figura 51).

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de possíveis metabólitos para o corante DR 167 são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Metabólitos obtidos após reação do corante Disperse Red 167 com a enzima nitroredutase.

Tipo de reação	Metabólitos	Estrutura	<i>m/z</i>	Tempo de retenção	Íons fragmento
Enzima imobilizada	((3-acetamido-4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)azanedil) bis(etano-2,1-diil) diacetato		476	3,67	434,2; 416,2

Fonte: autor do trabalho.

Observa-se que no caso das análises contendo a enzima imobilizada para o corante DR 167, houve a formação de apenas um metabólito principal, *m/z* 476, que se refere à redução do grupo nitro da molécula do corante DR 167. Os valores das áreas dos picos cromatográficos de XIC das amostras de biotransformação com enzima livre (Fig. 50A) e imobilizada (Fig. 62A) para o produto de *m/z* 476 mostraram valores bem superiores, cerca de cinco vezes maior, para a amostra contendo a enzima imobilizada (Fig. 62A).

Através da área dos cromatogramas totais da amostra controle e biotransformação, calculou-se a porcentagem de degradação para cada um dos corantes como mostra a Tabela 16.

Tabela 16 - Porcentagem de degradação dos corantes DR 73, DR 78 e Dr 167 através da área dos cromatogramas totais das amostras de controle e biotransformação.

	Porcentagem de degradação (%) nitroredutase em solução	Porcentagem de degradação (%) nitroredutase imobilizada
DR 73	72,0	62,8
DR 78	49,6	42,6
DR 167	78,7	55,5

Fonte: autor do trabalho.

Observa-se na Tabela 16 que a porcentagem de degradação para todos os corantes foi acima de 40%. As análises de biotransformação com a enzima em solução, para os três corantes, resultaram em valores superiores de porcentagem de degradação em relação à enzima imobilizada. Isso pode ser explicado pelo fato da enzima estar mais ativa no meio em que está livre na solução, porque a imobilização da enzima no suporte pode desativar alguma função da mesma, diminuindo a sua atividade enzimática e, conseqüentemente, a porcentagem de degradação. No entanto, os testes com a enzima imobilizada possibilitaram uso de menor quantidade de enzima e fácil remoção da mesma da solução, pois utilizou-se apenas um imã para separação da mesma da solução.

Estes resultados, embora que preliminares, indicam que o aumento da mutagenicidade dos metabólitos obtidos por redução do grupo nitro pela nitroredutase, presente na microflora intestinal, pode levar à formação de aminas, que sob nova redução gerariam N-hidroxilaminas, que podem ser formadas por acetilação, se tornando uma espécie ainda mais mutagênica ao induzir danos ao DNA, formando adutos. (60, 109, 110)

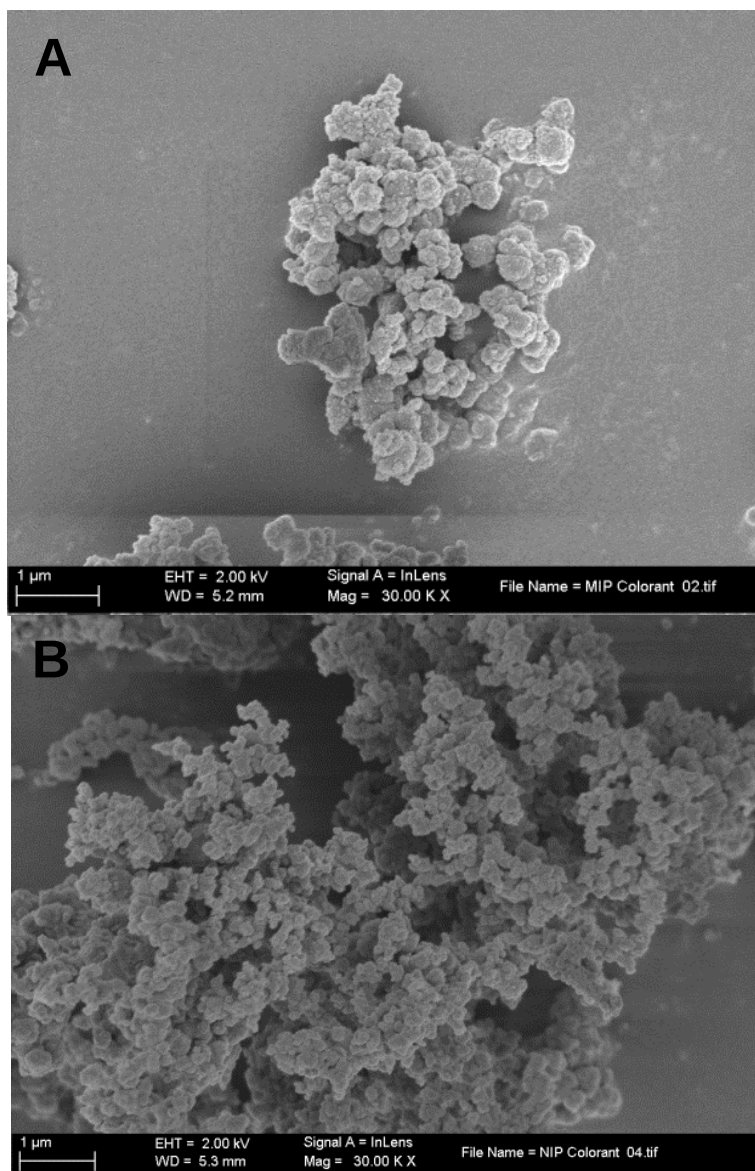
4.9 Aprisionamento e liberação do corante DR 73 em MMIP

Considerando que o corante DR 73, apresentou maior atividade mutagênica segundo resultados de avaliação de mutagenicidade pelo teste de Ames, escolheu nesta etapa este corante como modelo para estudos de aprisionamento e liberação do corante em polímeros molecularmente impressos (MIP) desenvolvidos como parte do doutorado sanduíche sob a supervisão da Prof. Dra. María Isabel Pividori, na Universidade Autônoma de Barcelona.

4.10 Características morfológicas do DR73-MMIP

Para observar a estrutura de formação e uniformidade dos polímeros sintetizados, DR73-MMIP e MNIP foram caracterizados morfológicamente pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, SEM e TEM, respectivamente. As Figuras 63 e 64 ilustram as imagens microscópicas, respectivamente, para MNIP e DR73-MMIP em acetonitrila.

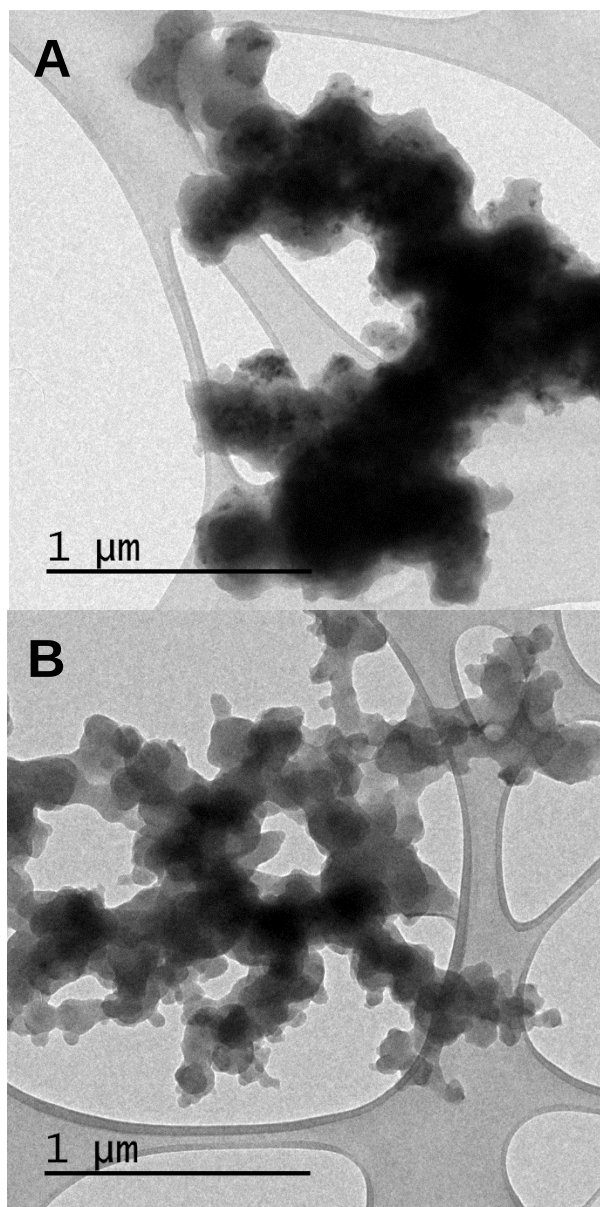
Figura 63- Imagens de SEM de DR73-MMIP (A) e MNIP (B) na amplificação de 30000x.



Fonte: autor do trabalho.

Observa-se que no MNIP (Fig. 63B), as partículas se encontram porosas e homogêneas e se exibem de forma agregada, o qual se assemelha ao magneto-MIP relatado na literatura por outros pesquisadores (92). No entanto, após aprisionamento do corante, Figura 63A (DR73-MMIP), as partículas estão mais aglomeradas em comparação com o observado no MNIP. Isto pode ser atribuído ao fato do MMIP manter as nanopartículas magnéticas de forma mais eficaz e intactas no seu interior, o que pode ser confirmado pelas imagens de TEM apresentadas a seguir na Figura 64.

Figura 64 - Imagens de TEM DR73-MMIP (A) and MNIP (B) na amplificação de 5000x.



Fonte: autor do trabalho.

Na Figura 64, observa-se que existe um considerável revestimento polimérico formado na camada externa do Fe_3O_4 usado como núcleo, resultando em um MMIP com excelente encapsulação de magnetita (Figura 64A).

4.11 Ligação do corante nos MIPs magnéticos

A análise da retenção do corante sobre o MIP magnético foi realizada utilizando-se isotermas de adsorção. Estas expressam a relação entre a quantidade do soluto adsorvido por uma superfície adsorvente (Q) em função da concentração de equilíbrio do soluto. Para isto,

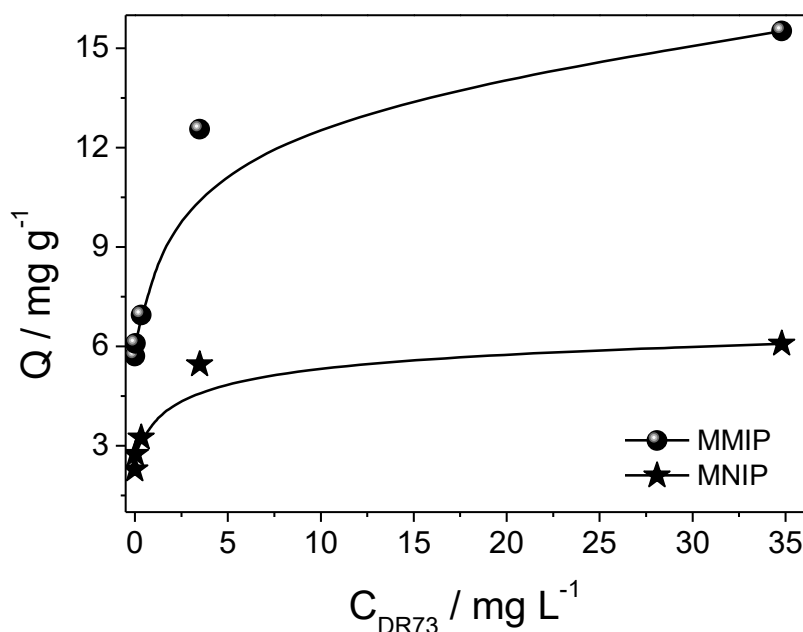
isotermas de adsorção foram construídas utilizando o adsorvente (MMIP ou MNIP) em contato com a solução que contém o componente a ser adsorvido (neste caso, o corante DR73) em diferentes concentrações e temperatura constante até alcançar o equilíbrio. A quantidade de material adsorvido (Q) foi determinada segundo a Equação 2 (111):

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{m_{pol}} \quad (2)$$

Onde: Q= quantidade em massa do analito retido por massa de adsorvente (MIP ou NIP), V (L) = volume total (aqui 700 μ L) e m_{pol} (g) = massa dos polímeros adsorventes (MMIP ou MNIP).

A quantidade de corante ligado aos polímeros foi calculada utilizando os valores da absorbância ($\lambda=509$ nm) dos sobrenadantes, onde a concentração do corante não ligada (C_f em mg L^{-1}) é subtraída da concentração inicial do corante na solução (C_i em mg L^{-1}). Durante as medidas, observou-se que a absorbância das soluções contendo corante + MMIP é inferior àquela do MNIP, mostrando que o encaixe do corante nas cavidades criadas pelo modelo do MMIP é mais eficiente. A Figura 65 ilustra as isotermas de adsorção dos adsorventes MMIP e MNIP na presença do corante.

Figura 65 - Isotermas de adsorção do corante DR73 para MMIP (●) e MNIP (★). Condições experimentais: V = 500 μ L de corante, 2 mg de polímero e 2 h de tempo de equilíbrio.

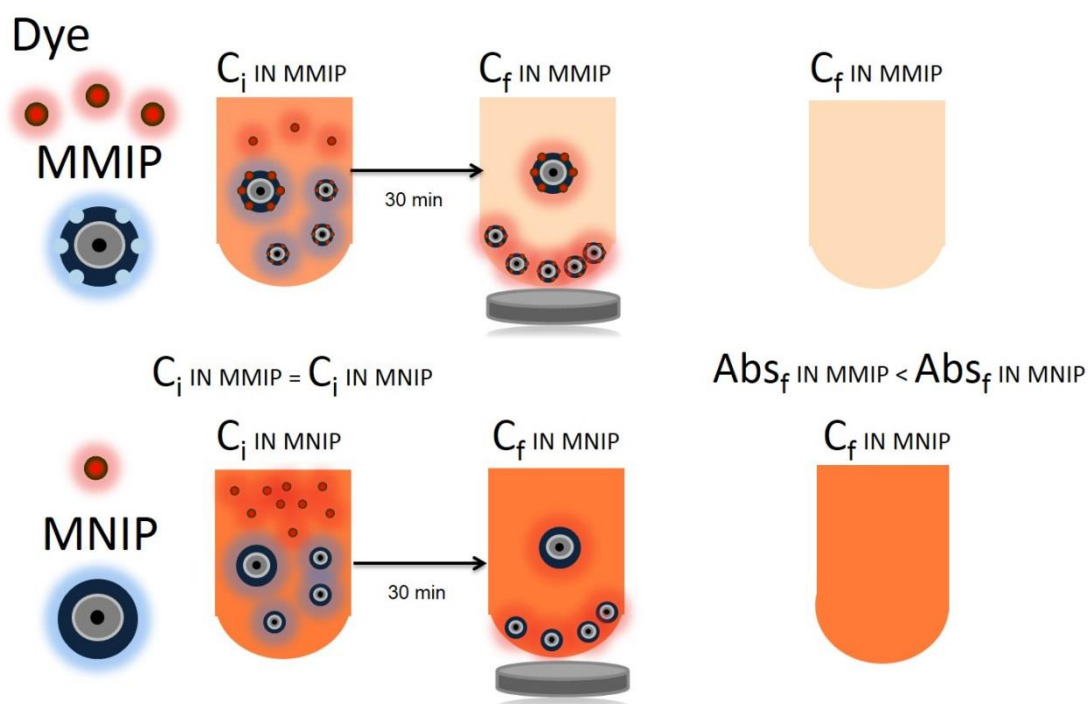


Fonte: autor do trabalho.

Observa-se na Figura 65 que o valor de religação do corante ao MMIP ($Q_{\max} \rightarrow 16 \text{ mg g}^{-1}$) é muito maior quando comparado ao valor encontrado para o MNIP ($Q_{\max} \rightarrow 6 \text{ mg g}^{-1}$) e a retenção é 2,7 vezes maior para o adsorvente MMIP. Isto pode ser indicativo de que as cavidades específicas formadas no MIP conferem maior probabilidade de inserção do corante contribuindo para o reconhecimento seletivo.

A Figura 66 mostra um esquema representativo do provável procedimento de ligação do corante no MMIPs.

Figura 66 - Representação da ligação do corante no MMIP e MNIP após 2 horas de reação.



Fonte: autor do trabalho.

Estes resultados indicam que o polímero molecularmente impresso formou cavidades específicas para retenção do corante e pode ser usado para extração do mesmo em soluções contendo $0,1$ a 35 mg L^{-1} do corante.

4.12 Liberação do corante DR 73 retido nos MIPs magnéticos

Vários solvents foram testado para a extração do corante retido nos MMIPs. O melhor eluente foi metanol/ácido acético, 9:1, que indicou extração de até 100% do MNIP e 68,7% para o MMIP. A Tabela 17 mostra os valores de absorbância e porcentagem correspondente à liberação do corante das nanopartículas magnéticas, MMIP e MNIP.

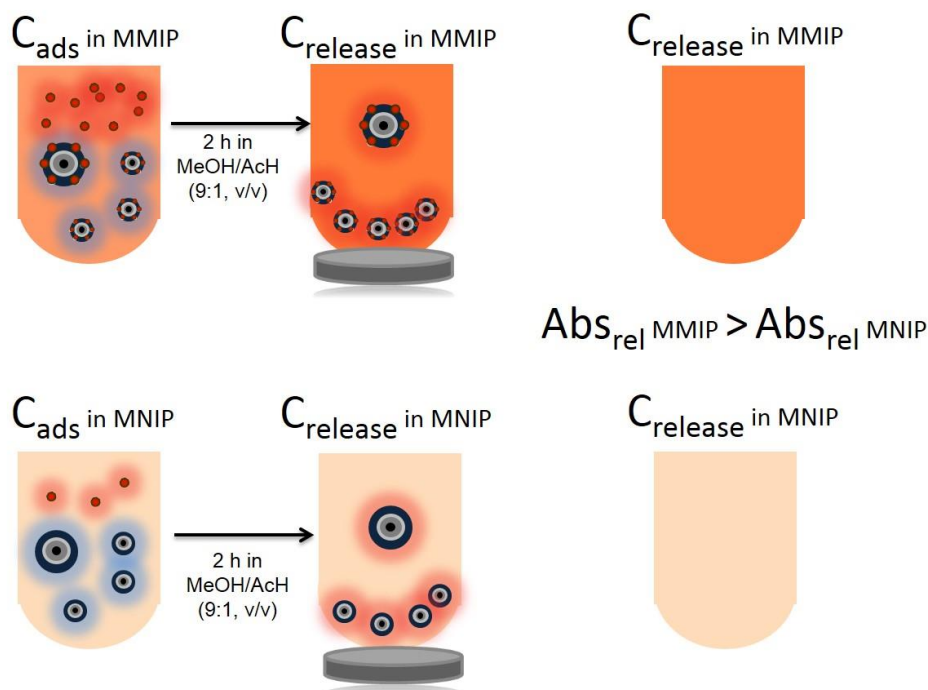
Tabela 17 - Comparação da porcentagem de corante liberado do MMIP e MNIP após extração com metanol e ácido acético.

Concentração do corante (mg L ⁻¹)	Absorbância do sobrenadante após liberação do corante					
	MMIP			MNIP		
	Esperado	Obtido	Porcentagem de DR 73 liberado do MMIP	Esperado	Obtido	Porcentagem de DR 73 liberado do MNIP
0,00348	0,292	0,201	68,7	0,117	0,117	100
0,0348	0,313	0,213	68,1	0,141	0,137	97,2
0,348	0,355	0,234	66,0	0,167	0,145	86,9
3,48	0,644	0,340	52,8	0,280	0,211	75,4
34,8	0,795	0,408	51,4	0,312	0,228	73,1

Fonte: autor do trabalho.

Observa-se que a quantidade de corante liberada dos MMIP é aproximadamente 1,7 vezes maior quando comparada ao MNIP. Este valores estão de acordo com os resultados mostrados na Figura 65, uma vez que o polímero seletivo é conhecido por ter uma maior capacidade de adsorção do corante, e, conseqüentemente, maior quantidade de corante é liberado para a solução durante a extração. No entanto, nos MNIP, de acordo com os dados da Tabela 17, aproximadamente 100 % do corante é liberado do MNIP em soluções mais diluídas. Este comportamento indica que o aprisionamento do corante nas cavidades do MNIP não ocorre de forma específica, caracterizando interações não seletivas. Este resultado torna a liberação do corante a partir deste adsorvente (MNIP) relativamente mais fácil e, conseqüentemente, o MNIP é menos adequado como adsorvente no processo de remoção do presente analito. A Figura 67 mostra o mecanismo representativo da liberação do corante DR 73 da nanopartícula magnética, MMIP.

Figura 67 - Esquema representativo da liberação de corante DR73 previamente adsorvido no MMIP e MNIP após 2 h de reação. Extração com metanol: ácido acético (MeOH / AcH, 1: 9, v / v).



Fonte: autor do trabalho.

Assim, de acordo com os dados acima, é possível concluir que os MMIPs magnéticos podem ser uma excelente alternativa para pré-concentrar o corante DR 73 provenientes de amostras de efluente contendo resíduos do corante nas nanopartículas com subsequente liberação por extração com o solvente. Deste modo, investigou-se a seguir a possibilidade de promover a degradação do corante extraído pelo processo de oxidação fotoeletrocatalítica.

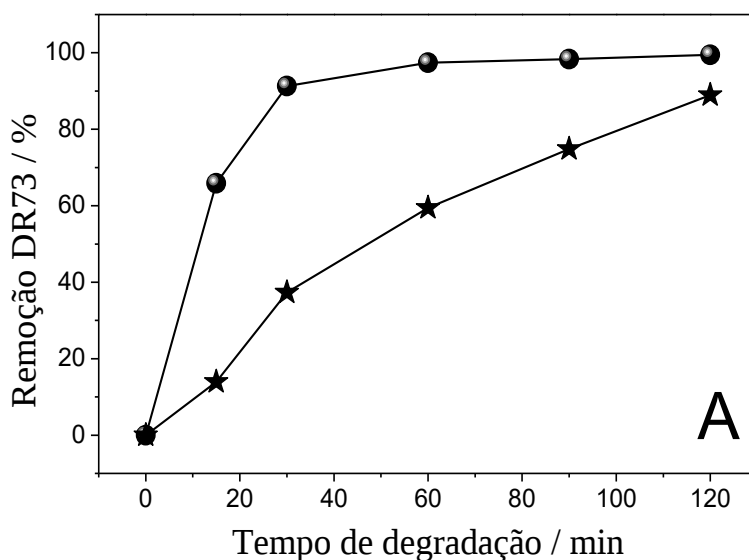
4.13 Oxidação fotoeletrocatalítica do corante Disperse Red 73 após a extração do corante em águas residuais com MMIP

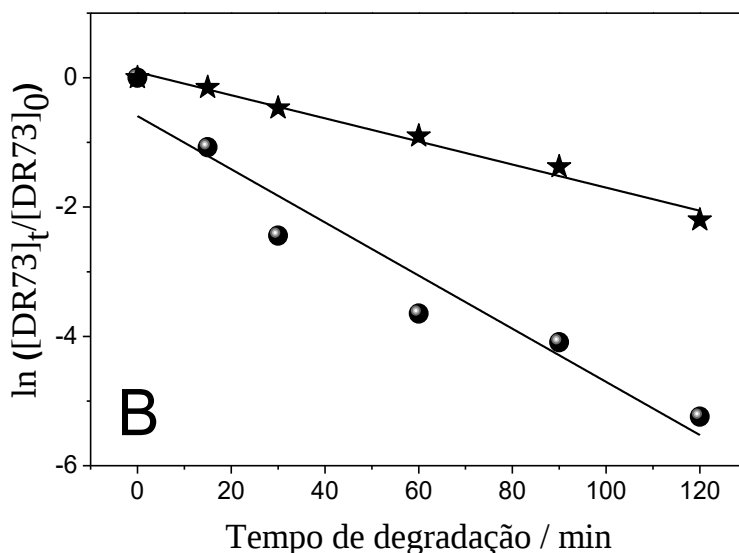
Considerando que o MMIP mostrou-se apto para pré-concentrar o corante DR73 em água e pode ser removido do sorvente usando uma mistura de metanol : água (1: 1, v / v) como eluente, testou-se inicialmente o método para águas residuais fortificadas com $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (3,48 mg L⁻¹) e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (34,8 mg L⁻¹) do corante. As duas concentrações escolhidas para estes experimentos foram feitas através da maior diferença de valores de adsorção entre MMIP e MNIP, e as condições foram as mesmas das adotadas ao longo do experimento (2 h para adsorção e 2 mg de adsorvente).

A seguir, a solução foi recolhida e submetida à análise espectrofotométrica. Para cada solução de partida, as concentrações dos sobrenadantes foram $8,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,29 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, correspondendo à recuperação de 84,2% e 22,9%. Estes resultados sugerem que, essencialmente, o MMIP pode ser uma boa ferramenta estratégica em termos de eficiência no que se refere à remoção de corante de efluentes em solução mais diluída do corante.

A fim de testar a eficácia do tratamento fotoeletrocatalítico, o corante eluído foi transferido para um compartimento de um reator fotoeletrocatalítico contendo eletrodos de nanotubos de Ti/TiO₂ como fotoânodo submetido a potencial de polarização de 2,5 V e irradiação UV durante 120 min, condições estas otimizadas para outros corantes semelhantes (112). A eficiência da oxidação fotoeletrocatalítica do corante foi monitorada por LC-MS/MS, segundo procedimento descrito para análise do corante DR73 (seção 3.7.4). Os resultados obtidos para tratamento de ambas as soluções extraídas do MIP são mostrados na Figura 68.

Figura 68 - (A) Degradação fotoeletrocatalítica do corante DR73 extraído do MMIP para concentrações iniciais do corante de (★) $2,29 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (●) $8,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curvas de cinética de pseudo-primeira ordem construídas a partir da Curva A.





Fonte: autor do trabalho.

Os cromatogramas de LC-MS/MS mostraram diminuição significativa no valor da área do pico em 4,40 min, m/z 349 correspondente, cujos dados foram usados para construir a Figura 68A. Observa-se que 100% do corante é degradado em apenas 60 min de tratamento para soluções mais diluídas do corante. Estes valores alcançaram 90 % para as soluções mais concentradas após 120 min de tratamento. De acordo com as análises de LC-MS/MS, não se detectou outros intermediários gerados durante o tratamento.

A Figura 68B mostra que a cinética de degradação do corante segue uma reação de pseudo-primeira ordem (cinética de Langmuir-Hinshelwood) e as constantes de velocidades de oxidação do corante foram $-0,018 \text{ min}^{-1}$ e $-0,041 \text{ min}^{-1}$, para as concentrações de partida de $2,29 \times 10^{-5} \text{ L}^{-1} \text{ mol}$ e $8,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados mostraram que o tratamento proposto para pré-concentração/extração e tratamento fotoeletrocatalítico do corante DR 73 seria uma alternativa mais viável para soluções mais diluídas do corante. Estes resultados revelam uma nova possibilidade para a descontaminação de água poluída, onde um contaminante desejado ou perigoso pode ser removido a partir de um meio com um grande volume de água usando MIP, e ao mesmo tempo, transferindo-o para um outro meio, onde ele pode ser completamente eliminado utilizando processo de oxidação avançado.

5 CONCLUSÕES

O sistema utilizando microssoma de fígado de rato foi uma abordagem viável para o estudo da biotransformação de corantes têxteis, uma vez que viabilizou a formação *in vitro* de novos metabólitos a partir da reação química com DR 73, DR 78 e DR 167. Os metabólitos identificados são relatados pela primeira vez e requerem mais estudos para avaliar a sua degradação e toxicidade no ambiente aquático e humano. Em conclusão, os corantes azo, DR 73, DR 78 e DR 167, podem ser metabolizados pelas enzimas hepáticas gerando compostos mutagênicos. Assim, estes corantes devem ser utilizados com precaução e eficazes tratamentos de efluentes e de água potável deverão ser aplicados, a fim de evitar o contato ambiental e humano com estes compostos, devido à geração de possíveis produtos mutagênicos após a exposição oral.

Os experimentos de biotransformação aqui realizados mostraram que a bactéria *E. coli* promove a clivagem completa de corantes dispersos, munidos de um grupo azo, provavelmente, devido à ação da enzima azoredutase. Esta clivagem conduz à formação do metabólito 3-4-aminofeniletíl-amino-propanitrila para o corante DR 73 e DR 78. 4-nitroanilina e 2-cloro-4-nitroanilina são os principais produtos de biotransformação de DR 73 e DR 78, respectivamente, o que sugere que DR 73 perde a nitrila (CN⁻). Os principais produtos de biotransformação do DR 167 são 3,3'-dimetil 3-acetamido-4-aminofenil-azanedil-dipropanoato e 2-cloro-4-nitroanilina. Nitrobenzaminas são alguns dos produtos obtidos após reação dos corantes com a *E. coli*. Estas aminas aromáticas normalmente originam de biodegradação dos corantes azo sob condições anaeróbias e podem ser causadas pela clivagem redutiva das ligações azo por microorganismos presentes em águas residuais 32.

A imobilização da enzima nitroredutase apresentou apenas um único produto de biotransformação para os três corantes têxteis analisados após a biotransformação. Os produtos 2-(2-(4-((2-cianoetil)(etil)amino)fenil)hidrazinil)-5-nitrobenzonitrila, 3-((4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)(etil)amino)propanenitrila e ((3-acetamido-4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil)fenil)azanedil)bis(etano-2,1-diil) diacetato foram obtidos, respectivamente, para os corantes, DR 73, DR 78 e DR 167, após a reação enzimática. Observa-se que a enzima nitroredutase atuou preferencialmente no grupo nitro da molécula dos corantes, ocasionando a redução do mesmo.

A abordagem LC-MS desenvolvida para avaliar a formação dos produtos de biotransformação são ferramentas fundamentais para a detecção e identificação de novos

compostos formados, mesmo em baixas concentrações. Assim, os experimentos de biotransformação utilizando microssomas de fígado de rato e enzimas redutoras, tais como, azoredutase e nitroredutase, confirmaram serem promissores para estudos de iniciais de biotransformação de azo moléculas com um elevado número de grupos nitro ou aminas substituídas.

Em conclusão, tanto os corantes têxteis originais e dos seus produtos de degradação podem ser prejudiciais para a saúde humana e para o ambiente. Considerando-se que as etapas de redução utilizados neste trabalho mimetizam as reações endógenas, compostos tóxicos podem ter origem no fígado humano e trato gastrointestinal após a exposição oral de DR 73, DR 78 e DR 167. Sendo assim, o uso de polímeros molecularmente impressos magnéticos (MMIP) se mostrou uma técnica específica e seletiva na adsorção de poluentes, tais como DR 73, das águas de efluentes e mananciais, podendo ser utilizado na remediação ou descontaminação de efluentes, juntamente com outros métodos de degradação, tal como a fotoeletrocatalise, com o objetivo de contribuir para a proteção ambientais de uma maneira eficiente e responsável.

REFERÊNCIAS

- 1 BARRETO, N. S. E. **Descoloração e detoxificação do azo corante Alaranjado II por *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. fluorescens* isolados e em cultura mista**. 2006. 192 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

- 2 ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 247-255, May 2001.

- 3 HASSEMER, M. E. N. **Oxidação fotoquímica - UV/H₂O₂ - para degradação de poluentes em efluentes da indústria têxtil**. 2006. 175 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

- 4 ZOLLINGER, H. **Color chemistry**: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. 2nd ed. New York: VCH, 1991. 496 p.

- 5 INGAMELLS, W. **Colour for textiles**: a user's handbook. Bradford: Society of Dyers and Colourists, 1993. 179 p.

- 6 VENKATARAMAN, K. **The chemistry of synthetic dyes**: the reactive dyes. New York: Academic Press, 1972. 209 p.

- 7 ALCÂNTRA, M. R.; DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 320-330, out. 1996.

- 8 SOCIETY OF DYERS AND COLOURISTS. **Colour index**: fourth edition online. Bradford. Disponível em: <http://colourindex.com/assets/files/upl/CI_leaflet.pdf>. Acesso em: 01 out. 2016.

- 9 TEIXEIRA, J. Têxtil: cadeia volta a ter superávit. **Química e Derivados**, n. 412, p. 26-40, fev. 2003.

- 10 ARSLAN, I.; BALCIOGLU, I. A. Oxidative treatment of simulated dyehouse effluent by UV and near-UV light assisted Fenton's reagent. **Chemosphere**, v. 39, n. 15, p. 2767-2783, Dec. 1999.

- 11 VAN DER ZEE, F. P.; VILLAVERDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes: a short review of bioreactor studies. **Water Research**, v. 39, n. 8, p. 1425-1440, Apr. 2005.

- 12 GOLOB, V.; TUSŠEK, L. VIS absorption spectrophotometry of disperse dyes. **Dyes and Pigments**, v. 40, n. 2/3, p. 211-217, Jan. 1999.

13 GARRIGÓS, M. C. et al. Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. **Journal of Chromatography**, v. 976, n. 1/2, p. 309-317, Nov. 2002.

14 UMBUZEIRO, G. A. et al. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais river. **Chemosphere**, v. 60, n. 1, p. 55-64, June 2005.

15 UMBUZEIRO, G. A. et al. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, v. 54, n. 11, p. 1589-1597, Mar. 2004.

16 OLIVEIRA, P. A. C. et al. Mutagenic compounds generated from the chlorination of disperse azo-dyes and their presence in drinking water. **Environmental Science Technology**, v. 40, n. 21, p. 6682-6689, Nov. 2006.

17 RAFII, F. et al. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 9, p. 897-901, Sept. 1997.

18 KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, jan. 2002.

19 STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 69-80, July 2001.

20 GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Textile dyes. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, jan. 2000.

21 ABRAHART, E. N. **Dyes and their intermediates**. 2nd ed. New York: Edward Arnold, 1977. 265 p.

22 ZHENGHUA, Z. et al. Study of competitive alcoholysis and hydrolysis of vinylsulfonyl reactive dyes. **Dyes and Pigments**, v. 14, n. 2, p. 129-142, Jan. 1990.

23 FRIJTERS, C. T. M. J. Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1249-1257, 2006.

24 GHOLAMI, M. et al. Textile dye removal by membrane technology and biological oxidation. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 38, n. 2, p. 379-391, Jan. 2003.

25 PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Removal of colour and COD from wastewater containing acid blue 22 by electrochemical oxidation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1/2, p. 83-88, May 2008.

26 LEWIS, D. M. Coloration in the next century. **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, v. 29, n. 1, p. 23-28, Oct. 1999.

27 BALMAIN, A.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 371-377, Mar. 2000

28 WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some N-nitroso compounds**. Lyon: IARCPress, 1978. (IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans, v. 17). Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono17.pdf>>. Acesso em: 7 out. 2016.

29 WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some industrial chemicals and dyestuffs**. Lyon: IARCPress, 1982. (IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, v. 29). Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono29.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2016.

30 DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 3, p. 437-441, Mar. 1995.

31 KINSLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Life (and death) in a malignant tumour. **Nature**, v. 379, n. 6560, p. 19-20, Jan. 1996.

32 STIBOROV, M. et al. The first identification of the benzenediazonium formation from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynphthalene (Sudan I) by microsomes of rat livers. **Cancer Letters**, v. 40, n. 3, p. 319-326, June 1988.

33 TURESKY, R. J. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1839-1845, Oct. 1991.

34 MANSUY, D. The great diversity of reactions catalysed by cytochromes P450. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 121, n. 1/3, p. 5-14, Nov. 1998.

35 GONZALEZ, F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. **Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 569, n. 1/2, p. 101-110, Jan. 2005.

36 HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, v. 48, n. 11, p. 520-522, Nov. 1994.

37 OLIVEIRA, D. P. et al. Chemical characterization of a dye processing plant effluente identification of the mutagenic components. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, n. 1/2, p. 135-142, Jan. 2007.

38 KIM, G. Y. et al. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. **Journal of Hazardous Materials**, v. 126, n. 1/3, p. 183-188, Dec. 2005.

39 MATSUO, A. Y. O. et al. Characterization of phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 78-84, Jan. 2008.

- 40 LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 120, n. 1, p. 43-49, May 1998.
- 41 KLEINOW, K. M. et al. Biotransformation and induction implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. **Environmental Health Perspectives**, v. 71, n. 1, p. 105-119, May 1987.
- 42 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, Feb. 1995.
- 43 EKINS, S. et al. Three and four dimensional-quantitative structure activity relationship (3D/4D-QSAR) analyses of CYP2C9 inhibitors. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, n. 8, p. 994-1002, Aug. 2000.
- 44 BRANDON, E. F. et al. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 189, n. 3, p. 233-246, June 2003.
- 45 UMBUZEIRO, G. A. 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, Jan. 2005.
- 46 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, 2003. p. 81-112.
- 47 PRIVAL, M. J. et al. Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 206, n. 2, p. 247-259, Oct. 1988.
- 48 CERNIGLIA, C. E. et al. Metabolism of azo dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethylbenzidine and 3,3'-dimethoxybenzidine to potentially carcinogenic aromatic amines by intestinal bacteria. **Carcinogenesis**, v. 3, n. 11, p. 1255-1260, Feb. 1982.
- 49 ZANONI, T. B. et al. CYP-450 isoenzymes catalyze the generation of hazardous aromatic amines after reaction with the azo dye Sudan III. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, n. 1, p. 217-226, Apr. 2013.
- 50 NOVOTNÝ, N. et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo-band anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1436-1442, Nov. 2006.
- 51 NIGAM, P. et al. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 435-442, June 1996.

- 52 CERNEGLIA, C. E. et al. Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black 38 by human intestinal microflora. **Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 175, n. 1, p. 11-16, Sept. 1986.
- 53 VERMA, P.; MADAMWAR, D. Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 615-618, Aug. 2003.
- 54 FRANCISCON, E. et al. 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, Apr. 2009.
- 55 FRANCISCON, E. et al. Potential of a bacterial consortium to degrade azo dye disperse red 1 in a pilot scale anaerobic-aerobic reactor. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 5, p. 816-825, May 2015.
- 56 LEHMAN-McKEEMAN, L. D. Mechanism-based inactivation of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by amino metabolites of musk xylene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 3, p. 384-389, Mar. 1997.
- 57 McLANE, K. E. et al. Reductive drug metabolism. **Drug Metabolism Reviews**, v. 14, n. 4, p. 741-799, Sept. 1983.
- 58 ORNA, M. V.; MASON, R. P. Correlation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes with redox properties of nitroaromatic compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 21, p. 12379-12384, July 1989.
- 59 LING, W.H. et al. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. **Journal of Nutrition**, v. 124, n. 1, p. 18-23, Jan. 1994.
- 60 SYMONS, Z. C.; BRUCE, N. C. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 6, p. 845-850, Dec. 2006.
- 61 HOWARD, P. C. et al. Reduction of the carcinogen 1-nitropyrene to 1-aminopyrene by rat intestinal bacteria. **Carcinogenesis**, v. 4, n. 8, p. 985-990. Aug. 1983.
- 62 SWEENEY, E. A. et al. Evidence of direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 6, p. 119-122, Oct. 1994.
- 63 BROWN, J. P. Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1283-1286, May 1983.
- 64 YAGUB, M. T. et al. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, n. 1, p. 172-84, July 2014.

- 65 SALLEH, M. A. M. et al. Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: a comprehensive review. **Desalination**, v. 280, n. 1/3, p. 1-13, Oct. 2011.
- 66 AHMARUZZAMAN, M. Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 1/2, p. 36-59, Aug. 2011.
- 67 SANGHI, R.; BHATTACHARYA, B. Review on decolorisation of aqueous dye solutions by low cost adsorbents. **Coloration Technology**, v. 118, n. 5, p. 256-269, Sept. 2002.
- 68 MURRAY, A.; ÖRMECI, B. Application of molecularly imprinted and non-imprinted polymers for removal of emerging contaminants in water and wastewater treatment: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p. 3820-3830, Nov. 2012.
- 69 HUANG, D. L. et al. Application of molecularly imprinted polymers in wastewater treatment: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 2, p. 963-977, Oct. 2014.
- 70 LAVIGNAC, N. et al. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 510, n. 2, p. 139-145, May 2004.
- 71 VLATAKIS, G. et al. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. **Nature**, v. 361, n. 6413, p. 645-647, Feb. 1993.
- 72 KINDSCHY, L. M.; ALOCILJA, E. C. A molecularly imprinted polymer on indium tin oxide and silicon. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 10, p. 2163-2167, Apr. 2005.
- 73 HAUPT, K. **Molecularly imprinted polymers: general principle of molecular imprinting**. Compiègne: Université de Technologie Compiègne. Disponível em: <http://www.utc.fr/~wmpi/index.php?option=com_content&view=article&id=4&Itemid=8> Acesso em: 04 ago. 2016.
- 74 TARLEY, C. R. T. et al. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicação de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, nov. 2005.
- 75 TAMAYO, F. G. et al. Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 482, n. 2, p. 165-173, Apr. 2003.
- 76 KAREUHANON, W. et al. Synthesis of molecularly imprinted polymers for nevirapine by dummy template imprinting approach. **Cromatographia**, v. 70, n. 11, p. 1531-1537, Dec. 2009.
- 77 FIGUEIREDO, E. C. et al. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361-375, jul. 2008.

78 JIANG, M. et al. Direct enrichment and high performance liquid chromatography analysis of ultra-trace bisphenol A in water samples with narrowly dispersible bisphenol A imprinted polymeric microspheres column. **Journal of Chromatography A**, v. 1110, n. 1/2, p. 27-34, Mar. 2006.

79 BESSEGATO, G. G. et al. Achievements and trends in photoelectrocatalysis: from environmental to energy applications. **Electrocatalysis**, v. 6, n. 5, p. 415-441, Sept. 2015.

80 LIU, N. et al. Some critical factors for photocatalysis on self-organized TiO₂ nanotubes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 11, p. 3499-3504, Nov. 2012.

81 PASCHOAL, F. M. M. et al. The photoelectrocatalytic oxidative treatment of textile wastewater containing disperse dyes. **Desalination**, v. 249, n. 3, p. 1350-1355, Dec. 2009.

82 CARDOSO, J. C. et al. Bubble annular photoelectrocatalytic reactor with TiO₂ nanotubes arrays applied in the textile wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 2, p. 1177-1184, June 2015.

83 XIE, Y. B.; LI, X. Z. Interactive oxidation of photoelectrocatalysis and electro-Fenton for azo dye degradation using TiO₂-Ti mesh and reticulated vitreous carbon electrodes. **Materials Chemistry and Physics**, v. 95, n. 1, p. 39-50, Jan. 2006.

84 FRANCISCON, E. et al. Polymerization study of the aromatic amines generated by the biodegradation of azo dyes using the laccase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 5, p. 360-365, Apr. 2010.

85 MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 2/3, p. 173-215, May 1983.

86 MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1/2, p. 29-60, Nov. 2000.

87 BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 97, n. 4, p. 267-281, Aug. 1982.

88 KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 471-478, Nov. 1993.

89 DAI, R. et al. Reduction of nitro phenols using nitroreductase from *E. coli* in the presence of NADH. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 1, p. 141-143, Oct. 2009.

90 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.

91 BELAZ, K. R. A.; OLIVEIRA, R. V. HPLC-fluorescence determination of EROD activity in wistar rat liver microsomes obtained by two different extraction procedures. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, p. 43-53, Feb. 2013.

92 UZURIAGA-SÁNCHEZ, R. J. et al. Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. **Food Chemistry**, v. 190, n. 1, p. 460-467, Jan. 2016.

93 CLAXTON, L. D. et al. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: II. With exogenous activation. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 253, n. 2, p. 149-159, Oct. 1991.

94 SARATALE, R. G. et al. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138-157, Jan. 2011.

95 FERRAZ, E. R. A. 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. 489-497, Oct. 2011.

96 PLANT, N. Strategies for using in vitro screens in drug metabolism. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 7, p. 328-336, Apr. 2004.

97 HARIPARSAD, N. et al. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 2, p. 135-153, Mar. 2006.

98 ZHANG, D. et al. Application of accurate mass spectrometry for metabolite identification. In: ZHANG, D.; SURAPANENI, S. (Ed.). **ADME-enabling technologies in drug design and development**. New York: John Wiley & Sons, 2012. Chap. 20, p. 317-330.

99 DIPPLE, A. et al. Metabolism of chemical carcinogens. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, n. 3, p. 265-296, 1985.

100 CHUNG, K. T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 114, n. 3, p. 269-281, Apr. 1983.

101 CHEQUER, F. M. 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, 2054-2063, Dec. 2011.

102 FUJITA, S.; PEISACH, J. Liver microsomal cytochromes P-450 and azoreductase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 13, 4512-4513, July 1978.

- 103 WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Nitrobenzene**. Lyon: IARCPress, 1996. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 65). Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol65/mono65-11.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2016.
- 104 OSUGI, M. E. et al. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photoelectrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 7, p. 2086-2093, Feb. 2009.
- 105 CHU, W.; MA, C. W. Reaction kinetics of UV-decolourization for dye materials. **Chemosphere**, v. 37, n. 5, p. 961-974, Aug. 1998.
- 106 EUROPEAN UNION. Council Directive 76/769/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. **Official Journal of the European Communities**, 27 Sept. 1976. L 262, p. 201-203. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31976L0769:en:HTML>>. Acesso em: 19 out. 2016.
- 107 WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some aromatic amines, organic dyes, and related exposures**. Lyon: IARCPress, 2010. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 99). Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol99/mono99.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2016.
- 108 PINHEIRO, H. M. et al. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 61, n. 2, p. 121-139, May 2004.
- 109 CHUNG, K. T.; CERNEGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 3, p. 201-220, Sept. 1992.
- 110 BONASSI, S. et al. Validation of biomarkers as early predictors of disease. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480/481, n. 1, p. 349-358, Sept. 2001.
- 111 TAGLIAFERRO, G. V. et al. Adsorção de chumbo, cádmio e prata em óxido de nióbio (V) hidratado preparado pelo método da precipitação em solução homogênea. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 101-105, jan. 2011.
- 112 BESSEGATO, G. G. et al. Combination of photoelectrocatalysis and ozonation: a novel and powerful approach applied in Acid Yellow 1 mineralization. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 180, p. 161-168, Jan. 2016.