UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis

Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Gisele Augusto Rodrigues de
Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma
de Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 12/06/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Gisele Augusto Rodrigues.

Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis.

Ribeirão Preto, 2013.

98 p.: il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Toxicologia.

Orientadora: Oliveira, Danielle Palma

1. Direct Black 38 2. Reactive Blue 15. 3. Cytotoxicity 4. Genotoxicity
5. Fibroblast (NDHF) 6. Keratinocyte (HaCat) 7. Mutagenicity 8.
Artificial sweat 9. Ecotoxicity.

* A foto da capa foi obtida em: <<http://ultrdownloads.com.br/papel-de-parede/Suor-Abstrato/>> Acesso em: 26 de abril de 2013.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Gisele Augusto Rodrigues

Título do trabalho: Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que, no decorrer da minha vida, me proporcionaram, além do imenso amor e carinho, os conhecimentos de integridade e responsabilidade. E ao meu marido pelo amor e companheirismo, sobretudo nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todas as bênçãos recebidas e por sempre me mostrar com sabedoria novos caminhos.

Aos meus pais, José Augusto e Célia, meus eternos exemplos de humildade e bondade, por sempre acreditarem em mim e me ensinarem que o estudo é a alma da vida.

À minha irmã e ao meu cunhado, Ana Paula e André, pelo carinho, apoio, estímulo, pela constante presença e torcida em minhas conquistas e, principalmente, pelos momentos de descontração que passamos juntos.

Ao meu marido, Márcio, meu exemplo de dedicação e persistência, por sempre me incentivar em todas as minhas escolhas e me fazer acreditar na minha capacidade.

Às minhas amigas, Renata e Natalícia pela amizade consolidada, pelo companheirismo, pelos momentos de distração e pelas experiências pessoais e profissionais compartilhadas.

À minha orientadora, Dra. Danielle, por quem tenho muito respeito e admiração, pela confiança e dedicação dispensadas na minha formação, pelos conhecimentos compartilhados e, sobretudo, pela amizade e compreensão.

Aos colegas de laboratório, pela atenção e pelo apoio e de modo especial ao Klaus, pela prestatividade.

Ao Dr. Joaquín de Lapuente e a toda a sua equipe, pela recepção, oportunidade e pelo aprendizado durante o estágio sanduíche.

Ao Prof. Dr. Daniel, pelo apoio, pela disponibilidade em ajudar e pelos conhecimentos compartilhados.

Às secretárias da Pós-graduação, Rosana e Rosemary pelo carinho a mim dispensado, pelo profissionalismo com os serviços prestados, pela competência e amizade construída durante esse período.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência”.

(Henry Ford)

“Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os nossos méritos”.

(Albert Einstein)

RESUMO

OLIVEIRA, G.A.R. **Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis**. 2013. 98f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O tingimento de tecidos começou há milhares de anos e a disponibilidade comercial de corantes é enorme e crescente. A indústria têxtil brasileira desempenha um papel de inquestionável importância, destacando-se entre as principais atividades econômicas do país. O processo de tingimento é um dos fatores fundamentais no sucesso comercial dos produtos têxteis, uma vez que o consumidor exige cores resistentes à exposição ao calor, à luz, à transpiração e às lavagens. Segundo a literatura, condições de transpiração intensa contribuem para uma alta taxa de migração e subsequente penetração de corantes têxteis para a pele humana. Além disso, 2 a 50% desses compostos permanecem no banho de tingimento e são descartados nos efluentes industriais, contaminando o ambiente e colocando em risco a saúde humana, uma vez que os métodos convencionais de tratamento de efluentes são ineficientes na remoção da coloração e da mutagenicidade de alguns corantes. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos toxicogenéticos do corante Direct Black (DB38) original e após extração por lixiviação com suor sintético, utilizando o teste do cometa com fibroblastos e queratinócitos de pele humana, o teste Anexina V com fibroblastos e o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*. Adicionalmente, foi investigada a ecotoxicidade dos corantes têxteis Direct Black 38 e Reactive Blue 15 (RB15) originais por meio de ensaios com sementes, daphnias, minhocas e zebrafish realizados na UTOX, em Barcelona. O corante DB38 original e lixiviado não induziram genotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos de pele humana. O corante DB38 original foi mutagênico para as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* na presença de S9. Entretanto, o corante lixiviado não induziu mutagenicidade para essas linhagens testadas, considerando que a maior taxa de migração do corante para a solução de suor foi de ~1% nas seguintes condições: tingimento sem ensaboamento, pH 8,0 e 8 horas de incubação à 42°C. O corante original é citotóxico para fibroblastos após 48 horas de exposição. No entanto, essa citotoxicidade não foi mais observada após a lixiviação no suor. Os corantes DB38 e RB15 originais não foram tóxicos para as sementes de pepino, alface e tomate, e nem para as minhocas *Eisenia foetida*. Ambos os corantes foram fracamente tóxicos para *Daphnia magna*, porém o RB15 apresenta maior potencial tóxico em relação ao DB38. Os corantes DB38 e RB15 induziram malformações em larvas de zebrafish *Danio rerio*, caracterizadas por falha na inflação da bexiga natatória e alteração na cauda. Portanto, nossos resultados mostram a importância de se fazer não só a análise individual de corantes têxteis, mas também dos tecidos que os contêm. Além da necessidade de se desenvolver técnicas de tingimento mais seguras em relação à solidez da cor sob condições úmidas e as perdas de corante para o ambiente durante a etapa de fixação, indicando maior atenção ao estudo de efeitos sub-letais na avaliação do impacto desses compostos no ecossistema aquático.

Palavras-chave: Direct Black 38, Reactive Blue, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Fibroblastos (NDHF), Queratinócitos (HaCat), Mutagenicidade, Suor sintético, Ecotoxicidade.

ABSTRACT

OLIVEIRA, G.A.R. **Toxicogenetic and ecotoxicological assessment of textile dyes.** 2013. 98f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The fabrics dyeing began thousands of years ago and the commercial availability of dyes is increasingly. The Brazilian textile industry plays a role of high importance, highlighting among the main economic activities in the country. The dyeing process is one of the key factors in the commercial success of textile products, since consumers are demanding colors more resistant to heat, light exposure, perspiration and washing. According to the literature, conditions of intense perspiration contribute to the migration and subsequent penetration of textile dyes to human skin. Furthermore, 2 to 50% of the initial dye load is present in the dye bath effluent and these compounds are discharged in industrial effluents, contaminating the environment and endangering human health, since the wastewater treatment systems are ineffective in removing the color and mutagenicity of some dyes. In this context, this study aimed to evaluate the toxicogenetic effects of the Direct Black 38 (DB38) dye original and extracted by leaching with artificial sweat using Comet assay with fibroblasts and keratinocytes from human skin, Anexin V assay with fibroblasts and *Salmonella* mutagenicity test. Additionally, we investigated the ecotoxicity of textile dye Direct Black 38 and Reactive Blue 15 (RB15) using assays with seeds, daphnias, worms and zebrafish performed in UTOX in Barcelona. The original and leached DB38 dye did not induce genotoxicity in fibroblasts and keratinocytes from human skin. The original DB38 was mutagenic for TA98 and TA100 of *S. typhimurium* with S9. However, the solution with the leached dye did not induce mutagenicity for these tested strains, since the highest migration rate of the dye to the solution of artificial sweat was ~ 1% in the following conditions: type of dyeing without rinsing, pH 8.0 and 8-hour incubation at 42°C. The original dye was cytotoxic for fibroblasts after 48 hours of exposure. However, this cytotoxicity was no longer observed after leaching in sweat. The original DB38 and RB15 dyes showed no toxicity for cucumber, lettuce and tomato seeds and for earthworms *Eisenia foetida*. Both dyes were weakly toxic for *Daphnia magna*, but the RB15 has a higher toxic potential compared to DB38. The dyes DB38 and RB15 induced malformations in larvae of zebrafish *Danio rerio* by failure of the swim bladder inflation and changes in the tail. Therefore, our results show the importance of making the individual analysis of textile dyes, but also of fabrics containing them. Furthermore, it is necessary to develop safer techniques of dyeing in relation to the color fastness under humid conditions and the loss of dyes into the environment during the fixation step, indicating more attention to the study of sub-lethal effects in the evaluation of the impact of these compounds in the aquatic ecosystem.

Keywords: Direct Black 38, Reactive Blue, Cytotoxicity, Genotoxicity, Fibroblast (NDHF), Keratinocyte (HaCat), Mutagenicity, Artificial sweat, Ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química dos principais grupos presentes em fibras têxteis naturais: (A) Celulose e (B) Proteína.....	03
FIGURA 2. As fases cinética e termodinâmica do processo de tingimento	04
FIGURA 3. A posição dos grupos cromóforos e auxocromos na estrutura química de corantes.....	05
FIGURA 4. Estrutura molecular dos corantes Direct Black 38 (A) e Reactive Blue 15 (B)	06
FIGURA 5. Fluxograma da resposta celular para os diferentes tipos de dano ao DNA.....	12
FIGURA 6. Cometa analisado em software. Coloração: SYBR green (A). Fotomicroscopia de fluorescência obtida nesse trabalho mostrando um fibroblasto com alto potencial de dano ao DNA. Visualização em aumento 40x. Coloração: brometo de etídeo (B).	34
FIGURA 7. Gráfico das etapas do tingimento com corante Direct Black 38	44
FIGURA 8. Tingimento das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 a temperatura de 50°C (A). Tingimento das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 e o controle (branco) antes da adição do álcali (B). Tingimento das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 e o controle (branco) após a adição do álcali (C)	45
FIGURA 9. Tingimento completo das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 e o controle (branco) antes e após a adição do álcali (A, B, respectivamente). Ensaboamento das fibras de algodão tingidas com o corante Direct Black 38 e o branco, em banho com o dispersante e defloculante Resiwash AC (C).....	46
FIGURA 10. Fibras de algodão referentes ao controle (branco) do tingimento (a) e fibras tingidas com o corante Direct Black 38 sem ensaboamento (b). Etapa de extração por lixiviação das fibras tingidas com corante Direct Black 38 (sem ensaboamento e completo) e dos controles no suor sintético nos diferentes pH (5,5; 6,5 e 8,0), tempos (2, 8 e 12 horas) e temperaturas (37°C e 42°C) de extração.....	48
FIGURA 11. Desenvolvimento das sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) após 120 horas de incubação com sulfato de zinco - controle positivo (A) e água destilada - controle negativo (B).....	50
FIGURA 12. Efeito do corante Direct Black 38 original sobre o DNA, observado pelo ensaio do cometa e a viabilidade celular de fibroblastos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. **p<0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: controle negativo, PBS; H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio 70 µM, controle positivo	55
FIGURA 13. Efeito do corante Direct Black 38 original sobre o DNA, avaliado pelo ensaio do cometa e a viabilidade celular de queratinócitos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. ***p<0,01 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: controle negativo, PBS; H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio 60 µM, controle positivo.	56

FIGURA 14. Efeito do corante Direct Black 38 original na viabilidade dos fibroblastos de pele humana após 3 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de incubação. CN: controle negativo (PBS); SSP: estaulosporina 15 µM, controle positivo de apoptose; H ₂ O ₂ : peróxido de hidrogênio 8,8 mM. Resultado de três repetições realizadas em duplicata. **p<0,05 e ***p<0,01 estatisticamente diferentes dos respectivos controles negativos	57
FIGURA 15. Curva dose-resposta para o corante Direct Black 38 original testado com as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 e TA100 na presença e ausência de ativação metabólica exógena (S9). Os números entre parênteses foram gerados pelo modelo de Bernstein <i>et al.</i> (1992), e representam a potência mutagênica do composto expresso em revertentes por µg. **p<0,05 estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles negativos (DMSO)	58
FIGURA 16. Perfil de extração por lixiviação do corante Direct Black 38 de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 37°C.....	59
FIGURA 17. Perfil de extração por lixiviação do corante Direct Black 38 de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 42°C.....	60
FIGURA 18. Comparação da intensidade de cor dos extratos obtidos por lixiviação das fibras tingidas sem a etapa de ensaboamento (A) e com tingimento completo (B) no suor sintético.	62
FIGURA 19. Porcentagem de corante Direct Black 38 lixiviado de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 37°C.....	62
FIGURA 20. Porcentagem de corante Direct Black 38 lixiviado de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 42°C.....	63
FIGURA 21. Efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com suor sintético sobre o DNA, detectado pelo ensaio do cometa e viabilidade celular de fibroblastos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. ***p<0,01 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação; H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio 70 µM, controle positivo	64
FIGURA 22. Efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com suor sintético sobre o DNA, detectado pelo ensaio do cometa e viabilidade celular de queratinócitos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. ***p<0,01 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação; H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio 60 µM, controle positivo	65

- FIGURA 23.** Efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com suor sobre a viabilidade dos fibroblastos de pele humana após 3 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de incubação. CN: solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação; SSP: estaulosporina 15 µM, controle positivo de apoptose; H₂O₂: peróxido de hidrogênio 8,8 mM. Resultado de três repetições realizadas em duplicata. **p<0,05 e ***p<0,01 estatisticamente diferentes dos respectivos controles negativos 66
- FIGURA 24.** Curva dose-resposta para o corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com suor, testado com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na presença e ausência de ativação metabólica exógena (S9) 67
- FIGURA 25.** Efeito dos corantes Direct Black 38 (A) e Reactive Blue 15 (B) sobre a imobilidade de *Daphnia magna* após 48 horas de exposição. *CE₅₀ = 1698,2 mg/L e **CE₅₀ = 686,5 mg/L 71
- FIGURA 26.** Efeito dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 sobre a bexiga natatória (A, C) e a cauda (B, D) de larvas de zebrafish (*Danio rerio*), após 96, 120 e 144 horas de exposição. CN: água de diluição - controle negativo 72
- FIGURA 27.** Fotomicroscopia obtida neste trabalho, mostrando o efeito do corante Reactive Blue 15 sobre a bexiga natatória de larvas de zebrafish (B) após 144 horas de exposição. (D) Efeito do corante Direct Black 38 sobre a cauda de larvas de zebrafish após 48 horas de exposição. Controle negativo: água de diluição (A, C). Visualização em aumentos de 2x e 3x, respectivamente 73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características genéticas das linhagens de <i>S. typhimurium</i> utilizadas no teste Salmonella/microsossoma empregada no presente trabalho.....	16
TABELA 2. Taxa de reversão espontânea em revertentes por placa esperada para a linhagem de <i>Salmonella typhimurium</i> usada neste trabalho	42
TABELA 3. Composição química do suor sintético	47
TABELA 4. Concentrações do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento e completo, utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH, tempos e temperaturas de extração. A seta indica a situação em que houve a maior taxa de migração do corante para a solução de suor sintético.....	61
TABELA 5. Número de revertentes induzidos pelo corante Direct Black 38 original e extraído por lixiviação com suor, utilizando as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 e TA100 na presença de ativação metabólica exógena (S9).	68
TABELA 6. Taxa de germinação das sementes e comprimento das raízes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>), alface (<i>Lactuca sativa</i>) e tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) após 120 horas de incubação na ausência de luz, à 20°C ± 1°C com os corantes Direct Black 38 (DB38) e Reactive Blue 15 (RB15). Os resultados estão apresentados como média de três repetições ± DP (desvio-padrão).....	69
TABELA 7. Número de minhocas vivas por concentração testada no início (N0) e no final do teste (N48), após 48 horas de exposição com os corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15	70
TABELA 8. Resultados de cada repetição do ensaio do cometa em cultura de fibroblastos de pele humana após 3 horas de exposição ao corante Direct Black 38 na forma original e extraído por lixiviação com suor sintético. Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (DP) de três repetições.....	96
TABELA 9. Resultados de cada repetição do ensaio do cometa em cultura de queratinócitos de pele humana após 3 horas de exposição ao corante Direct Black 38 na forma original e extraído por lixiviação com suor sintético. Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (DP) de três repetições.....	97
TABELA 10. Número de revertentes por placa para o corante Direct Black 38 original e extraído por lixiviação com suor sintético testado com as linhagens TA98 e TA100 de <i>Salmonella</i> na presença e ausência de ativação metabólica exógena (S9). Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão (DP) de ensaios realizados em triplicata.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQUM	Associação Brasileira da Indústria Química
ABIT	Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecções
ANOVA	Análise de Variância
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
DB38	Direct Black 38
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ETAD	Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry
FBM	Fibroblast Basal Medium
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
His ⁻	Auxotrofia para Histidina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	International Agency for Research on Cancer
-N=N-	Grupamento Azo
NADP	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PI	Iodeto de Propídeo
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RB15	Reactive Blue 15
SABESP	Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo

SBMCTA	Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental
S9	Sistema de Metabolização Exógena
UTOX	Unidade de Toxicologia Experimental e Ecotoxicologia

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 A Evolução dos Corantes e a Implantação da Indústria Têxtil	01
1.2 Processo de Tingimento das Fibras.....	02
1.2.1 Fibras têxteis	02
1.2.2 Mecanismo de reação corante/fibra.....	03
1.2.3 Propriedades e classificação dos corantes.....	04
1.3 Toxicidade dos Corantes Têxteis	07
1.3.1 Sudorese	09
1.4 Avaliação Toxicogenética	10
1.4.1 Genotoxicidade e Mutações	10
1.4.2 Ensaio do cometa	12
1.4.3 Ensaio de mutagenicidade com Salmonella ou Teste de Ames	14
1.4.4 Indução de morte celular	16
1.5 Contaminação Ambiental	18
1.6 Avaliação ecotoxicológica	20
1.6.1 Teste de toxicidade aguda com sementes	21
1.6.2 Teste de toxicidade aguda com Eisenia foetida.....	22
1.6.3 Teste de toxicidade aguda com Daphnia magna.....	23
1.6.4 Ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish (Danio rerio).....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27

3.1 Material	27
3.1.1 Corantes estudados.....	27
3.2 Métodos	27
3.2.1 Ensaio toxicogenético.....	27
3.2.1.1 Ensaio do cometa utilizando fibroblastos de pele humana (NHDF) e queratinócitos humanos (HaCaT).....	28
3.2.1.1.1 Cultura de fibroblastos de derme humana adulta (NDHF).....	28
3.2.1.1.1.1 Soluções utilizadas.....	28
3.2.1.1.1.2 Cultivo e manutenção dos fibroblastos.....	28
3.2.1.1.1.2.1 Descongelamento dos fibroblastos	28
3.2.1.1.1.2.2 Repique e manutenção dos fibroblastos	29
3.2.1.1.1.2.3 Congelamento dos fibroblastos.....	29
3.2.1.1.1.3 Contagem das células para ensaios	29
3.2.1.1.2 Cultura de queratinócitos humanos (HaCaT)	30
3.2.1.1.2.1 Soluções utilizadas.....	30
3.2.1.1.2.2 Cultivo e manutenção dos queratinócitos.....	30
3.2.1.1.2.2.1 Descongelamento dos queratinócitos	30
3.2.1.1.2.2.2 Repique e manutenção dos queratinócitos	31
3.2.1.1.2.2.3 Congelamento dos queratinócitos.....	31
3.2.1.1.2.3 Contagem das células para os ensaios.....	32
3.2.1.1.3 Procedimento de ensaio.....	32
3.2.1.1.3.1 Soluções utilizadas.....	32
3.2.1.2 Avaliação da Viabilidade Celular	35
3.2.1.2.1 Método de exclusão do corante Trypan Blue	35
3.2.1.3 Indução de morte celular em fibroblastos de pele humana	36
3.2.1.4 Ensaio com Salmonella/microsossoma ou Teste de Ames.....	37
3.2.1.4.1 Meios de cultura e soluções.....	37
3.2.1.4.2 Preparo das culturas de uso rotineiro.....	40
3.2.1.4.3 Avaliação das características genéticas das linhagens.....	40
3.2.1.4.4 Protocolo de pré-incubação.....	42
3.2.1.4.5 Avaliação da viabilidade	43
3.2.2 Tingimento da fibra têxtil.....	43
3.2.2.1 Tingimento com adição de álcali e sem ensaboamento	44
3.2.2.2 Tingimento completo (com adição de álcali e ensaboamento)	45
3.2.3 Síntese dos três tipos de suor: ácido, básico e neutro.....	46

3.2.4 Extração por lixiviação do corante da fibra tingida no suor.....	47
3.2.5 Monitoramento e quantificação do corante <i>Direct Black 38</i> lixiviado no suor nas múltiplas condições, por meio de análise cromatográfica	48
3.2.5.1 Extração em fase sólida das amostras lixiviadas no suor sintético	48
3.2.5.2 Análise cromatográfica das amostras lixiviadas no suor sintético. .	49
3.2.6 Ensaio ecotoxicológicos	49
3.2.6.1 Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>), pepino (<i>Cucumis sativus</i>) e alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	49
3.2.6.2. Teste de toxicidade aguda com <i>Eisenia foetida</i>	51
3.2.6.3 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	51
3.2.6.3.1 Soluções.....	51
3.2.6.3.2 Organismo-teste.....	52
3.2.6.3.3 Procedimento de ensaio.....	52
3.2.6.4 Teste de toxicidade com zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	53
3.2.6.4.1 Soluções.....	53
3.2.6.4.2 Manutenção do zebrafish e aquisição dos ovos.....	53
3.2.6.4.3 Procedimento de ensaio.....	54

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação toxicogenética do corante <i>Direct Black 38</i> antes e após a extração por lixiviação de fibras de algodão tingidas.....	55
4.1.1 Avaliação da genotoxicidade do corante <i>Direct Black 38</i> original utilizando o teste do cometa com fibroblastos de pele humana	55
4.1.2 Avaliação da genotoxicidade do corante <i>Direct Black 38</i> original utilizando o teste do cometa com queratinócitos de pele humana	56
4.1.3 Avaliação da citotoxicidade do corante <i>Direct Black 38</i> original utilizando o ensaio com <i>Anexina V</i> e Iodeto de Propídeo com fibroblastos de pele humana.....	57
4.1.4 Avaliação da mutagenicidade do corante <i>Direct Black 38</i> original utilizando o Ensaio com <i>Salmonella/microsoma</i>	58
4.1.5 Monitoramento e quantificação do corante <i>Direct Black 38</i> lixiviado no suor nas múltiplas condições, por meio de análise cromatográfica.....	59
4.1.6 Avaliação da genotoxicidade do corante <i>Direct Black 38</i> lixiviado no suor sintético utilizando o teste do cometa com fibroblastos de pele humana.....	63
4.1.7 Avaliação da genotoxicidade do corante <i>Direct Black 38</i> lixiviado no suor sintético utilizando o teste do cometa com queratinócitos de pele humana.....	64

4.1.8 Avaliação da citotoxicidade do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético utilizando o ensaio com Anexina V e Iodeto de Propídeo com fibroblastos de pele humana.....	65
4.1.9 Avaliação da mutagenicidade do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético utilizando o Ensaio com Salmonella typhimurium.....	67
4.2 Efeitos ecotoxicológicos dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 ...	68
4.2.1 Avaliação da fitotoxicidade dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais utilizando o teste de germinação de sementes e crescimento de raízes de pepino, alface e tomate	68
4.2.2 Avaliação da toxicidade aguda dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre minhocas Eisenia foetida.....	69
4.2.3 Avaliação da toxicidade aguda dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre Daphnia magna	70
4.2.4 Determinação de malformações induzidas pelos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre embriões e larvas de zebrafish (Danio rerio).....	71
5. DISCUSSÃO	74
5.1 Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação das fibras têxteis com suor	74
5.2 Ecotoxicidade dos corantes originais Direct Black 38 e Reactive Blue 15	78
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICES	96
Apêndice A: Resultados de cada experimento do Ensaio do Cometa em fibroblastos e queratinócitos de pele humana para o corante Direct Black 38 original e após extração por lixiviação com suor sintético	96
Apêndice B: Resultados do Ensaio de Mutagenicidade com Salmonella/microsoma com o corante Direct Black 38 original e após extração por lixiviação com suor sintético realizado em triplicata	98

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Evolução dos Corantes e a Implantação da Indústria Têxtil

As cores sempre exerceram fascínio sobre a humanidade. Por toda a história, os corantes e pigmentos foram ferramentas importantes em atividades comerciais (REVISTA ELETRÔNICA DE QUÍMICA [QMCWEB], 2012). O primeiro corante a ser conhecido pelo homem foi o Negro-de-Fumo (*Carbon Black*) e com o tempo muitos corantes naturais foram sendo descobertos. No Período Glacial, os caçadores utilizavam fuligem e ocre para pintar as paredes das cavernas, criando obras que resistem há milênios. Na Roma Antiga, a cor púrpura, obtida de um molusco marinho chamado *Murex*, era símbolo de riqueza e poder, sendo utilizada nas vestes reais. Outro corante natural muito utilizado era o índigo, conhecido desde os egípcios até os bretões, extraído da planta *Isatis tinctoria* e que, ainda hoje é utilizado para dar coloração ao jeans (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA [ABIQUIM], 2012).

O primeiro corante orgânico sintetizado foi o Mauve, obtido em 1856 na Inglaterra, por William H. Perkin, através da oxidação da fenilamina com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (SMITH, KANAWA, 2008; ABIQUIM, 2012). Após essa descoberta, diversos corantes foram sintetizados. No fim do século XIX, houve a instalação de fábricas de corantes sintéticos na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça, que forneciam insumos para as indústrias de tecidos, couro e papel, seguidos por China, Índia e Indonésia nos anos 90 (ABIQUIM, 2012).

No Brasil, foi o setor têxtil que iniciou o processo de industrialização. Suas raízes precedem a chegada e a ocupação do país pelos portugueses, uma vez que os índios que aqui habitavam já exerciam atividades artesanais, utilizando-se de técnicas primitivas de entrelaçamento manual de fibras vegetais e produzindo telas grosseiras para várias finalidades, inclusive para proteção corporal (PORTAL TEXTILIA.NET: O maior conteúdo da cadeia têxtil, 2010).

Portanto, o setor têxtil representa um dos ramos industriais mais antigos do país e do mundo, sendo um dos segmentos precursores da Revolução Industrial. Até 1950, este ramo industrial não apresentou grande evolução do ponto de vista tecnológico. Após tal década, porém, e pela incorporação de outras áreas como a química, mudanças significativas ocorreram, tanto no âmbito produtivo, como no

comercial (FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS [FINEP], 2010). Atualmente, no Brasil, as indústrias têxteis constituem um setor de grande importância na economia, sendo o sétimo parque industrial do mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TEXTIL E DE CONFECÇÕES [ABIT], 2012).

1.2 Processo de Tingimento das Fibras

A tecnologia moderna no tingimento consiste de várias etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras (GUARATINI, ZANONI, 2000).

O processo de tingimento das fibras têxteis é constituído por três etapas: a montagem, a fixação e o tratamento final. A montagem é a fase na qual o corante é transferido da solução para a superfície da fibra podendo ser feita por esgotamento (processo descontínuo) ou por impregnação (processo contínuo). A segunda fase corresponde à fixação que é a reação entre o tecido e o corante, feita através de reações químicas e que pode envolver basicamente quatro tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e covalentes. A última etapa é o ensaboamento que consiste de uma lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes (ALCÂNTARA, DALTIM, 1996; GUARATINI, ZANONI, 2000). Este processo evita que o corante que não se ligou à fibra, se desprenda no momento em que o tecido for umedecido novamente, com o suor, por exemplo, durante o uso da roupa ou na lavagem, manchando outras roupas no mesmo banho (ALCÂNTARA, DALTIM, 1996).

1.2.1 Fibras têxteis

As fibras têxteis podem ser divididas e classificadas em dois grandes grupos denominadas fibras naturais e sintéticas. As fibras naturais podem ser de origem animal, vegetal ou mineral (lã, seda, algodão, linho e amianto), baseadas em celulose e proteína (Figura 1). As fibras sintéticas são comercializadas como viscose, acetato de celulose, poliamida, poliéster e acrílico (ALCÂNTARA, DALTIM,

1996; GUARATINI, ZANONI, 2000). Cada fibra possui características e propriedades diferentes que irão conferir aos tecidos aplicações diversas. Daí a grande importância de se conhecer de forma profunda as fibras têxteis e seus aspectos técnicos, a fim de selecionar a fibra e os processos adequados para se atingir os objetivos desejados (PICCOLI, 2008).

FIGURA 1. Estrutura química dos principais grupos presentes em fibras têxteis naturais: (A) Celulose e (B) Proteína (Fonte: GUARATINI, ZANONI, 2000).

Estudos recentes têm mostrado que alguns corantes têxteis podem migrar do tecido tingido e penetrar na pele humana em casos de transpiração excessiva (BROOKSTEIN, 2009; LADEMANN *et al.*, 2009; MEINKE *et al.*, 2009). Considerando esse fato, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar os efeitos toxicogenéticos da solução resultante da extração por lixiviação do corante Direct Black 38 de fibras têxteis com suor sintético. Para tanto, o algodão foi escolhido como modelo, pois devido às características climáticas do Brasil, a produção da indústria têxtil é baseada principalmente nesta fibra natural (70%), que é constituída basicamente por celulose, ceras naturais e proteínas. O grande número de grupos hidroxilas da celulose propicia ao algodão uma grande capacidade de absorver água (cerca de 50% de seu peso) (ALCÂNTARA, DALTIM, 1996) e por isso é largamente utilizado em países de clima quente, devido à sua capacidade em absorver o suor.

1.2.2 Mecanismo de reação corante/fibra

Como já citado, existem três etapas fundamentais no processo de tingimento: montagem, fixação e tratamento final. Na fase de fixação, há duas etapas importantes para a compreensão do processo de tingimento, de acordo com a Teoria Geral do Tingimento:

- Fase Cinética: determina a velocidade de deslocamento do corante para a superfície da fibra, a velocidade de difusão e de adsorção dentro dela, assim como, as influências de concentração de corante e eletrólitos, pH e temperatura.

- Fase Termodinâmica: analisa os fatores que favorecem a fixação do corante na fibra, sendo denominados de “afinidade”.

A Figura 2 apresenta as etapas do processo de tingimento (PICCOLI, 2008).

FIGURA 2. As fases cinética e termodinâmica do processo de tingimento (Fonte: PICCOLI, 2008).

1.2.3 Propriedades e classificação dos corantes

Algumas propriedades como cor intensa, afinidade (substantividade ou reatividade), solubilidade permanente/temporária ou dispersabilidade, difundibilidade e solidez devem ser avaliadas durante o comportamento tintorial. A constituição química dos corantes também possui alguns aspectos importantes que influenciam no processo de tingimento e na solidez à luz e a tratamentos úmidos. O tamanho da molécula, os grupos funcionais presentes, a planaridade e o número de grupos iônicos interferem na difusão do corante para fibra e, conseqüentemente, na solidez do substrato tingido (PICCOLI, 2008).

A molécula dos corantes possui grupos de átomos responsáveis pela cor, denominados de cromóforos (grupos azo, metano antraquinona, carbonil, ftalocianina) e substituintes que modificam ou intensificam a cor dos cromóforos e ainda conferem solubilidade ao corante, conhecidos como auxocromos (amino, carboxílico, sulfônico e hidroxílico) (SANTOS *et al.*, 2007). A Figura 3 mostra a posição desses grupos funcionais relacionados à estrutura química dos corantes.

FIGURA 3. A posição dos grupos cromóforos e auxocromos na estrutura química de corantes (Fonte: <<http://www.transtutors.com/chemistry-homework-help/chemistry-in-action/theory-of-dyes.aspx>> Acesso em: 22 de abril de 2013).

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química ou com método pelo qual ele é fixado à fibra têxtil. De acordo com o modo de fixação, os corantes são classificados em reativos, diretos, azóicos, ácidos, à cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores (GUARATINI, ZANONI, 2000). Para este estudo foram escolhidos dois grupos de corantes aplicáveis às fibras celulósicas que serão descritos a seguir.

Corantes Diretos – Estes corantes são também chamados de substantivos, devido à grande substantividade (capacidade do corante de se deslocar do banho de tingimento para a fibra) em relação à fibra celulósica. Caracterizam-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose) através de interações de Van der Waals. A afinidade do corante é aumentada pelo uso de eletrólitos (que aumenta a força iônica do meio), pela planaridade na configuração da molécula do corante ou a dupla ligação conjugada que aumenta a adsorção do corante sobre a fibra. A maioria desses compostos é azo sulfonados, contendo mais de um grupo azo (diazó, triazo) ou pré-transformados em complexos metálicos (ALCÂNTARA, DALTIM, 1996; GUARATINI, ZANONI, 2000; PICCOLI, 2008).

Corantes Reativos - são corantes com alta solubilidade em água e que contêm um ou mais grupos eletrofílicos (reativos) capazes de formar ligação covalente com grupos hidroxilas das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo, antraquinona ou ftalocianina como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Nesta classe de corantes, a reação química se processa diretamente através da substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose. A reação desse corante com as fibras é obtida em meio

alcalino. Eles apresentam melhor propriedade de solidez do que os corantes diretos e outros tipos de corantes devido ao estabelecimento de ligação covalente entre o corante e a fibra, que confere maior estabilidade na cor do tecido tingido ao contrário dos demais corantes em que o processo de coloração se opera através de ligações de maior intensidade (ALCÂNTARA, DALTIM, 1996; GUARATINI, ZANONI, 2000).

Devido à intensa utilização desses compostos pelas indústrias de tingimento têxtil, o corante Direct Black 38 (DB38), um corante direto com a função azo como grupo cromóforo e o Reactive Blue 15 (RB15), um corante reativo com o grupamento ftalocianina de cobre responsável pela cor, foram selecionados para esse trabalho e estão apresentados na Figura 4.

FIGURA 4. Estrutura molecular dos corantes Direct Black 38 (A) e Reactive Blue 15 (B).

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado na indústria pertence à família dos azo corantes (60 a 70%) (MANSOUR *et al.*, 2007; MANSOUR *et al.*, 2012), o que demonstra que esta é a maior classe de corantes com uma grande variedade de cores (BAE, FREEMAN, 2007).

Os azo compostos se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos azo (-N=N-) ligados a sistemas aromáticos (KUNZ *et al.*, 2002; MANSOUR *et al.*, 2007) e podem estar relacionados às várias categorias de corantes, como por exemplo, básico, direto, dispersivo e azóico (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004). 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 (GUARATINI, ZANONI, 2000).

Os corantes ftalocianinas também são comumente usados na síntese de corantes com tonalidades em azul ou verde e, frequentemente estão relacionados à categoria dos reativos. Os corantes reativos que contêm o grupamento ftalocianina são caracterizados por alta solidez da cor, estabilidade e resistência à degradação oxidativa (MATTHEWS, BOTTOMLEY, PAVLOSTATHIS, 2009).

1.3 Toxicidade dos Corantes Têxteis

Como mencionado anteriormente, há milhares de corantes disponíveis no mercado para a utilização nas indústrias têxteis. A toxicidade aguda desses compostos não é relevante, já que cerca de 90% dos 4000 corantes avaliados pela ETAD (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry) apresentaram valores de DL_{50} para ratos maiores que 2×10^3 mg/kg, sendo que os maiores valores foram atribuídos aos corantes tipo azo (ROBINSON *et al.*, 2001; OSUGI *et al.*, 2006). Muitos corantes, apesar de terem sido submetidos a uma avaliação toxicológica preliminar a sua utilização, têm se mostrado potencialmente ecotóxicos, genotóxicos e/ou mutagênicos em inúmeros trabalhos da literatura (TSUBOY *et al.*, 2007; CHEQUER *et al.*, 2009; OSUGI *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VACCHI *et al.*, 2013).

Entretanto, considerando que existem mais de 3.000 tipos de azo corantes disponíveis para os vários ramos industriais e que seus efeitos tóxicos estão intimamente relacionados com a natureza e a posição dos substituintes ligados ao grupo azo, há a necessidade de se realizar a avaliação da toxicidade de cada corante individualmente, tendo em vista que pequenas mudanças na molécula podem alterar drasticamente suas propriedades tóxicas (CHUNG, STEVENS, 1993; CHEQUER *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2010).

Aproximadamente 130 de 3200 azo corantes em uso produzem aminas aromáticas carcinogênicas após a clivagem reductiva da ligação azo. No passado, azo corantes baseados em benzidina, 3,3'-diclorobenzidina, 3,3'-dimetilbenzidina e 3,3'-dimetoxibenzidina foram sintetizados em larga escala (BAE, FREEMAN, 2007). Estudos em trabalhadores expostos demonstraram que ocorre azo-redução desses corantes no homem, gerando aminas aromáticas que podem causar câncer de

bexiga (GOLKA, KOPPS, MYSLA, 2004). A redução de azo corantes a aminas aromáticas pode ser catalisada por enzimas da fração microsomal do fígado e também por azoredutases produzidas pela microbiota intestinal (FRANCE, CARTER, JOSEPHY, 1986).

Os azo corantes que entram no corpo humano pela ingestão podem ser metabolizados em aminas aromáticas pelas azoredutases dos microrganismos intestinais (CHUNG, STEVENS, CERNIGLIA, 1992; RAFII, HALL, CERNIGLIA, 1997; TSUBOY *et al.*, 2007). Já os corantes que entram no organismo humano através do contato dérmico, poderão ser metabolizados a aminas aromáticas por bactérias presentes na pele (STAHLMANN *et al.*, 2006).

Dessa forma, os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e tóxicos de azo corantes poderiam decorrer da ação direta do próprio agente ou de derivados aril amina, gerados durante a biotransformação da ligação azo (RAFII, HALL, CERNIGLIA, 1997; RAJAGURU *et al.*, 1999; GUARATINI, ZANONI, 2000).

O corante Direct Black 38 (Figura 4A) é um triazo, à base de benzidina, uma amina aromática, classificada como carcinógeno humano pela International Agency for Research on Cancer (IARC) (MANTHUR *et al.*, 2005). Embora a Comunidade Européia (DIRECTIVE 2002/61/EC of the EUROPEAN PARLIAMENT) tenha banido o uso de corantes a base de benzidina desde 2003 (DIRECTIVE 2002/61/EC), esse composto tem sido detectado em diversos países, como México (BANDALA *et al.*, 2008), Índia (MANTHUR *et al.*, 2005) e Brasil (SAUER *et al.*, 2006). De acordo com Dapson (2009), o uso de corantes a base de benzidina é ainda muito comum em países subdesenvolvidos, onde as ambições em relação ao comércio internacional superam as preocupações quanto ao risco à saúde e ao ambiente (DAPSON, 2009).

O corante Reactive Blue 15 (Figura 4B), que também é objeto desse estudo, apresenta o ftalocianina de cobre como grupamento cromóforo e é amplamente utilizado na indústria de curtume e de tingimento têxtil. Há poucos dados na literatura sobre a toxicidade desse corante, no entanto, sabe-se que é tóxico para a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* (OSUGI *et al.*, 2006) e moderadamente genotóxico para girinos de *Rana hexadactyla* (RAJAGURU *et al.*, 2001).

Assim, uma vez que um corante com características tóxicas possa ser introduzido no corpo através da pele, por meio da transpiração, este poderá causar efeitos prejudiciais às células expostas e até mesmo induzir danos sobre o DNA

humano (SPEIT, 2009; LORD, ASHWORTH, 2012). Dentro deste contexto, este trabalho propôs simular as condições de transpiração, com o intuito de avaliar a migração do corante das fibras tingidas em laboratório para as soluções sintéticas de suor e analisar os possíveis efeitos tóxicos para a cultura de fibroblastos e queratinócitos de pele humana e mutagênicos para as linhagens de *Salmonella typhimurium*, mimetizando o sistema citocromo P-450 através da adição de um sistema de metabolização exógena (fração S9).

1.3.1 Sudorese

Os humanos têm a habilidade de transpirar até 1,8 L por hora e a sudorese é uma função fisiológica importante para o controle e a manutenção da temperatura corporal em aproximadamente 37°C, mesmo em diferentes climas. Além disso, o suor mantém a hidratação e a plastificação da camada córnea (NASCIMENTO, RAFFIN, GUTERREZ, 2004).

O suor é produzido por glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas. As glândulas écrinas são responsáveis pela sudorese, sendo mais numerosas, menores e distribuídas por toda a superfície corporal. Por outro lado, as glândulas apócrinas têm tamanho muito maior que as écrinas, encontram-se localizadas nas axilas, abdômen e região púbica e estão relacionadas ao desenvolvimento sexual. Devido ao seu pequeno número, sabe-se que estas não contribuem na termorregulação. O suor écrino consiste de uma solução eletrolítica diluída que contém principalmente cloreto de sódio, potássio, amônia e bicarbonato, além de substâncias orgânicas, como lactato e uréia. Embora seja mais abundante que o suor apócrino, trata-se de uma solução muito diluída para originar o odor axilar, conferindo também à pele um pH ácido (4,7 para os homens e 6,0 para as mulheres) que se opõe à proliferação bacteriana (NASCIMENTO, RAFFIN, GUTERREZ, 2004). O pH da pele humana porém pode variar com a transpiração e regiões do corpo (STEFANIAK, HARVEY, 2006).

O uso de roupas tingidas permite o contato direto do corante têxtil com a pele humana (BROOKSTEIN, 2009). Apesar do extrato córneo da pele promover a proteção do corpo contra agentes tóxicos (KATRITZKY *et al.*, 2006), dados na literatura mostram que em casos de transpiração excessiva, alguns corantes têxteis

são capazes de migrar do tecido tingido e penetrar na pele humana (BROOKSTEIN, 2009; LADEMAN *et al.*, 2009; MEINKE *et al.*, 2009).

1.4 Avaliação Toxicogenética

Tendo em vista todo o potencial tóxico dos corantes têxteis e a falta de dados sobre os riscos que eles oferecem quando a exposição é feita através de roupas tingidas, este trabalho avaliou a toxicidade genética provocada por uma solução de corante lixiviada da fibra têxtil no suor sintético.

Para isso, foram escolhidos dois ensaios que detectam danos distintos ao DNA: ensaio do cometa em fibroblastos e queratinócitos de pele humana, que detecta quebra na cadeia de DNA e ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*/microsoma, que detecta mutações de ponto. Os ensaios de citotoxicidade com Anexina V e iodeto de propídeo também foram utilizados para avaliar a capacidade da solução de corante resultante da lixiviação no suor em induzir morte celular em fibroblastos de pele humana por necrose e/ou apoptose.

Como objetivo principal desse projeto era avaliar os efeitos tóxicos das soluções dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 lixiviados de fibra de algodão tingida em laboratório, utilizando suor sintético como extrator, fez-se necessário a remoção do corante Reactive Blue 15, uma vez que esse corante foi testado por nosso grupo e apresentou resultados preliminares negativos para os ensaios do cometa em fibroblastos de pele humana e teste de AMES. O mesmo fato foi observado para outros corantes reativos, o que permite concluir que esta classe de corantes é constituída por mutágenos fracos em relação à indução de danos primários ao DNA e de mutações de ponto. Porém, outros ensaios de toxicidade devem ser realizados, para garantir a segurança no uso desta classe.

1.4.1 Genotoxicidade e Mutações

Uma substância é dita genotóxica quando tem a capacidade de reagir com o DNA diretamente ou após sua ativação metabólica, produzindo danos em sua estrutura e/ou função (WEISBURGER, 1999). Quando esses danos são transmitidos à descendência diz-se que ocorreu uma mutação (SANTELLI, 2003). As mutações fornecem a variação genética na qual a seleção da evolução opera (GRIFFITHS *et al.*, 2001a). Porém, elas são responsáveis por várias doenças hereditárias humanas,

entre elas o câncer (GRIFFITHS *et al.*, 1998a). Sua ocorrência se dá de maneira espontânea ou induzida por mutágenos (LEWIS, 2004).

Níveis em que ocorre uma mutação

Uma mutação pode ocorrer em dois níveis diferentes:

- Mutação cromossômica: segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros ou mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram (GRIFFITHS *et al.*, 1998a).
- Mutação gênica: os eventos mutacionais ocorrem dentro de genes individuais (GRIFFITHS *et al.*, 1998a). É também denominada de mutação de ponto, uma vez que as alterações ocorrem em pares de bases únicos do DNA ou num pequeno número de bases adjacentes (GRIFFITHS *et al.*, 2001b). O ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, utilizado neste trabalho, detecta mutações de ponto. Assim, esta forma de mutação será mais detalhada a seguir.

Tipos de mutação de ponto

Ao nível de DNA, existem dois tipos principais de alterações mutacionais de ponto: as substituições de bases e as adições ou deleções de bases. Essas últimas têm consequências na sequência de polipeptídeos que vão bem além do local de mutação. Como a sequência do mRNA é “lida” pelo aparelho traducional em grupos de três pares de bases (códon), a adição ou deleção de um único par de bases de DNA mudará a matriz de leitura, começando do local da adição ou deleção e se estendendo até o terminal carboxila da proteína. Assim, estas lesões são chamadas mudanças de matriz de leitura ou deslocamento do quadro de leitura (GRIFFITHS *et al.*, 2001b).

As células vivas desenvolveram uma série de sistemas enzimáticos que reparam o DNA danificado por uma variedade de mecanismos. Alguns sistemas enzimáticos neutralizam compostos potencialmente danosos antes que eles reajam com o DNA (GRIFFITHS *et al.*, 2001b). Outros já agem sobre o próprio dano no DNA (BROWN, 1999). Uma falha nestes sistemas pode levar a uma maior taxa de mutação (GRIFFITHS *et al.*, 1998b).

Baseado no exposto, quando acontece um dano no DNA, vários são os eventos que podem ocorrer, como ilustrado na Figura 5. Em células sob proliferação,

será ativado o ciclo celular, conduzindo a um bloqueio no mesmo, o que fornecerá tempo para que o mecanismo de reparo seja ativado. Em células diferenciadas o sistema de reparo será ativado diretamente. Quando o reparo é completo, a célula poderá prosseguir o seu ciclo. Se o dano não puder ser reparado ou se houver muitas lesões no DNA, o ciclo celular poderá ser bloqueado permanentemente, conduzindo ao envelhecimento da célula ou induzindo apoptose. Se lesões não reparadas permanecerem sem serem detectadas, acarretará o aparecimento de mutações e instabilidade genômica, o que poderá conduzir à oncogênese (HOUTGRAAF, VERSMISSSEN, GIESSEN, 2006).

FIGURA 5. Fluxograma da resposta celular para os diferentes tipos de dano ao DNA (Fonte: HOUTGRAAF, VERSMISSSEN, GIESSEN, 2006).

1.4.2 Ensaio do cometa

Nas últimas décadas, diversas metodologias para avaliação de danos ao DNA têm sido desenvolvidas e, dentre elas, o ensaio do cometa tem sido considerado como uma das mais eficientes ferramentas para tal finalidade. Este destaque é devido ao teste ser sensível, rápido e econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (MITCHELMORE, CHIPMAN, 1998; TICE *et al.*, 2000). O ensaio não é empregado para detectar mutagenicidade, mas sim lesões genômicas (genotoxicidade) que, após serem processadas, podem se tornar mutações. Desta maneira, o teste do cometa tem sido indicado como um método apto a detectar

mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (KOPPEN *et al.*, 1999; GONTIJO, TICE, 2003).

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros pesquisadores a desenvolverem uma metodologia capaz de mensurar danos no DNA em células individuais com a utilização da eletroforese em gel. Para o sucesso de tal técnica, os pesquisadores consideraram o comportamento da molécula de DNA em células individualizadas, bem como sua organização dentro do núcleo. Deste modo, as células foram embebidas em agarose e dispostas em uma lâmina de microscopia, tendo as membranas lisadas por detergentes, as proteínas nucleares extraídas por altas concentrações de sais e, conseqüentemente, a liberação do DNA. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese sob condições neutras e os nucleóides migraram em direção ao anodo. As células com alta frequência de quebras no DNA apresentaram migrações em diferentes velocidades pelos diferentes fragmentos de DNA com diferentes tamanhos, gerando a aparência de uma cauda de cometa. Ao contrário, as células sem danos não apresentaram essas caudas e são chamadas nucleóides. Entretanto, esta técnica permite somente a detecção de quebra de fita dupla de DNA, o que limita o método. Em 1988, Singh e colaboradores inovaram este método, utilizando a eletroforese em pH alcalino ($\text{pH} > 13$), o que tornou possível a detecção de quebra de fita simples e sítio álcali-lábeis, aumentando assim a sensibilidade do método, visto que quase todos os compostos genotóxicos induzem mais esses tipos de danos do que quebra de fita dupla de DNA. Hoje, conforme o pH da eletroforese, o teste do cometa pode detectar quebras de fita dupla e simples, ligações cruzadas, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos e excisão de sítios incompletos de reparo (TICE *et al.*, 2000, GONTIJO, TICE, 2003, COLLINS, 2008).

Além do baixo custo, alta sensibilidade e fácil execução, o grande uso desse ensaio pode ser explicado pela flexibilidade quanto aos tipos de células que podem ser usadas. Qualquer célula eucariota pode ser utilizada nos ensaios (TICE *et al.*, 2000).

Esse método pode ser aplicado em diagnósticos e tratamentos médicos, em estudos ecotoxicológicos, em medicina ocupacional e no biomonitoramento ambiental. A maior vantagem desse teste é a possibilidade de sua aplicação em

diferentes tipos celulares que não necessariamente estejam em proliferação, tanto in vitro quanto in vivo (SINGH *et al.* 1988; TICE *et al.*, 2000). Este ensaio também é muito utilizado devido à flexibilidade, pois qualquer célula eucariota pode ser utilizada no teste do cometa (TICE *et al.*, 2000).

Este trabalho utilizou fibroblastos e queratinócitos de pele humana, não provenientes de células cancerosas, e que apresentam uma alta capacidade de diferenciação. Assim, esses tipos celulares permitem uma melhor correlação dos possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos para os seres humanos, facilitando a extrapolação de resultados.

1.4.3 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* ou Teste de Ames

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* é um ensaio de curta duração utilizado para detectar substâncias que podem causar mutações de ponto. Está em uso por mais de 20 anos devido à sua alta sensibilidade (83%) e reconhecida validação (JARVIS *et al.*, 1996). Além disso, é recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental para proteção da saúde humana e do meio ambiente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004) e reconhecido por comunidades científicas, agências e corporações governamentais (MORTELMANS, ZEIGER, 2000). É usado mundialmente como um ensaio inicial para determinar a mutagenicidade de novas drogas e substâncias químicas porque há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

Assim, esse teste pode ser aplicado para a avaliação da qualidade do ar, esgoto, sedimentos, efluentes do processo industrial, água para consumo humano, tecidos animais, solos (JARVIS *et al.*, 1996), além de produtos químicos, naturais, sintéticos e fitoterápicos (SBMCTA, 2004).

As linhagens de *Salmonella* usadas no teste sofreram mutações nos genes responsáveis pela biossíntese da histidina e por isso não são capazes de produzir esse aminoácido (JARVIS *et al.*, 1996). Assim, outra mutação é necessária para fornecer subsídios às células bacterianas e permitir que elas cresçam na ausência

do referido aminoácido. Essa mutação ocorre quando as bactérias usadas são expostas a agentes mutagênicos (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

Bactérias não têm o sistema de oxidação via citocromo P450 usado pelos vertebrados na biotransformação de xenobióticos. Como alguns dos metabólitos produzidos pelo citocromo P450 associado com enzimas são mutagênicos, é importante mimetizar esse sistema nos ensaios com bactérias através da adição da fração S9. Nos casos em que se associa o Teste de Ames com ativação metabólica exógena, esta é feita mediante adição de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com Aroclor-1254 (mistura S9). Assim, as substâncias que exercem sua atividade mutagênica após metabolização via citocromo P450 serão detectadas pela adição de S9 e os mutágenos que não precisam ser metabolizados por essa via para exercerem seu efeito mutagênico, serão identificados sem S9 (MARON, AMES, 1983; JARVIS *et al.*, 1996).

Linhagens de Salmonella typhimurium

As linhagens de *Salmonella* usadas no ensaio pertencem ao grupo de Enterobactéria capazes de produzir azoredutase e nitroredutase, especialmente desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA (MARON, AMES, 1983).

Assim, o ensaio *Salmonella*/microsoma, apesar de ser um teste bacteriano, 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 microbiota intestinal de mamíferos (UMBUZEIRO *et al.*, 2005a).

As linhagens usadas podem reverter espontaneamente a auxotrofia para histidina (His⁻) e assim podem crescer em um meio pobre no referido aminoácido. Esta é uma reversão espontânea relativamente fraca que pode ser aumentada através de mutações. Cada linhagem tem uma faixa característica de reversão espontânea. O aumento desta taxa permite avaliação da mutagenicidade das substâncias analisadas (MARON, AMES, 1983, MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos. A escolha de outras linhagens depende da disponibilidade e tipo da

amostra, do foco do estudo e do conhecimento prévio do material a ser testado (CLAXTON *et al.*, 1987, MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

A Tabela 1 mostra as características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste trabalho e obtidas da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) de São Paulo.

TABELA 1. Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma empregada no presente trabalho.

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	<i>hisD3052</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , <i>bio</i> ³ , Δ <i>uvrB</i> ⁴ , pKM101 (Ap ^r) ⁵	Deslocamento do quadro de leitura	MARON e AMES (1983)
TA100	<i>hisG46</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , <i>bio</i> ³ , Δ <i>uvrB</i> ⁴ , pKM101 (Ap ^r) ⁵	Substituição de pares de bases	MARON e AMES (1983)

¹ *his* mutação responsável pela síntese da histidina

² *rfa* permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

³ dependência à biotina

⁴ Δ *uvrB* deleção do gene *uvrB*

⁵ Ap^r ampicilina resistente

1.4.4 Indução de morte celular

Vários são os mecanismos pelos quais os compostos citotóxicos podem causar danos às células, dentre eles pode-se citar: a interferência na integridade das membranas e citoesqueleto, no metabolismo, na síntese e degradação ou liberação de constituintes ou produtos celular, na regulação de íon e na divisão celular (SEIBERT *et al.*, 1996). Aqueles que afetam o metabolismo de energia celular, homeostase de Ca²⁺ e estado redox e finalmente causam necrose, podem também induzir apoptose (WYLLIE, 1997).

Apoptose é um processo normal no qual os organismos pluricelulares mantêm a homeostasia dos seus tecidos. Esse processo é também importante para a regulação do sistema imune e para a eliminação de células infectadas por patógenos (PIRET *et al.*, 2004). As anormalidades na regulação deste evento podem conduzir a patologias como doenças autoimunes, neurodegenerativas, AIDS e câncer (PIRET *et al.*, 2004, ELMORE, 2007). A apoptose é um processo coordenado e dependente de energia que envolve a ativação de um grupo de cisteína proteases chamadas caspases e uma cascata complexa de eventos (ELMORE, 2007). É muito importante ressaltar que além de auxiliar nos estudos de citotoxicidade, a verificação

de morte por apoptose é muito útil para avaliar a capacidade de uma célula fixar uma mutação. Assim, a deficiência da célula em sofrer apoptose contribui com a carcinogênese, uma vez que a supressão da apoptose pode desencadear a iniciação de tumores, além de sua progressão e metástase (LOWE, LIN, 2000). Dessa forma, é possível identificar células pré-dispostas ao desenvolvimento do câncer quando expostas a agentes mutagênicos (EGUCHI *et al.*, 1997).

Já a morte celular por necrose, ao contrário, segue um caminho independente de energia. Esses dois processos podem ocorrer independentemente, sequencialmente ou simultaneamente. Em alguns casos os tipos e/ou o grau de estímulo que determina se a célula morre por necrose ou apoptose (ELMORE, 2007).

Na necrose as células incham e a membrana plasmática se rompe o que resulta na liberação do conteúdo citoplasmático para os tecidos vizinhos e recrutamento de células inflamatórias, desencadeando um processo inflamatório. Uma vez que na apoptose a membrana permanece íntegra e as células são rapidamente fagocitadas por macrófagos ou células normais adjacentes, não há reação inflamatória (ELMORE, 2007).

Nos últimos anos pesquisas têm sido conduzidas no intuito de desenvolver e avaliar o uso de testes *in vitro* como pré-triagem e até mesmo substituição dos ensaios *in vivo* (SEIBERT *et al.*, 1996).

O ensaio com anexina V oferece a possibilidade de detectar as fases iniciais de apoptose antes da perda da integridade da membrana plasmática. O método se baseia no fato de que, nos estágios iniciais da apoptose, a fosfatidilserina, um fosfolípido carregado negativamente, é translocada da parte interna da membrana plasmática para a superfície externa da célula. A anexina V, uma proteína Ca^{2+} dependente, tem alta afinidade por este fosfolípido, o que a torna um marcador sensível de morte celular por apoptose. Porém, essa exposição da fosfatidilserina também ocorre na necrose, o que diferencia as duas vias de morte é que, na apoptose, a célula permanece com a membrana intacta (VERMES *et al.*, 1995).

Sendo assim, é necessário executar o ensaio em conjunto com um teste capaz de determinar a integridade da membrana (teste de viabilidade celular). As células apoptóticas excluem todos os corantes que estão em uso nos ensaios de viabilidade, como o iodeto de propídeo (PI), o que não ocorre com as células

necróticas, nas quais esse corante se liga às bases nitrogenadas do DNA (VERMES *et al.*, 1995).

1.5 Contaminação Ambiental

Embora a economia de água em processos produtivos esteja ganhando especial atenção devido ao valor agregado que tem sido atribuído a este bem, a possibilidade de escassez de água em um futuro próximo é uma realidade preocupante. A exemplo disso, há uma previsão anunciada pela Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (SABESP), que estima que em um futuro próximo a demanda de água será superior à capacidade hídrica dos mananciais do estado (KUNZ *et al.*, 2002; COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO [SABESP], 2009). Este problema ambiental está relacionado não só ao desperdício por mau uso desse recurso, mas também ao lançamento de efluentes industriais e domésticos (FERRAZ, 2011).

A indústria é a atividade que mais contribui para a contaminação ambiental, visto que a maioria dos seus processos utiliza grandes volumes de água levando, conseqüentemente, à produção de rejeitos líquidos contendo espécies tóxicas ou difíceis de serem degradadas (SALLES, PELEGRINI, PELEGRINI, 2006).

Entre os vários setores responsáveis pela poluição ambiental, a indústria de tingimento das mais variadas fibras têxteis é considerada uma das maiores contribuidoras, devido ao seu grande parque industrial instalado gerar considerável quantidade de efluentes carregados com corantes e outras substâncias químicas indesejáveis (ARSLAN *et al.*, 2000; GUARATINI, ZANONI, 2000; KUNZ *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2004; GUENDOUZ *et al.*, 2012, MANSOUR *et al.*, 2012), os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação de mananciais (KUNZ *et al.*, 2002). Somado à geração de resíduos altamente coloridos, este setor industrial ainda consome grandes volumes de água utilizados nas operações de tingimento e acabamento dos produtos têxteis (GUENDOUZ *et al.*, 2012, MANSOUR *et al.*, 2012). De acordo com a literatura, para o processamento de cada quilograma de algodão são consumidos em média 200 litros de água (CARNEIRO *et al.*, 2004), que na maioria das vezes não é reutilizada.

Para atender à demanda do mercado consumidor em relação às cores e tonalidades, como também à resistência da fixação dos corantes às fibras têxteis,

10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente (SPADARO, GOLD, RENGANATHAN, 1992; RAJAGURU *et al.*, 1999; ROBINSON *et al.*, 2001) o que representa uma produção anual de cerca de 800.000 toneladas desses agentes no mundo (MANSOUR *et al.*, 2007) e das quais 26.500 são produzidas somente no Brasil (KUNZ *et al.*, 2002).

Como citado anteriormente, o processo de tingimento envolve várias etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil e as características dos corantes e pigmentos. Independente das características do(s) corante(s) escolhido(s), todo processo de tintura envolve como operação final uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes (GUARATINI, ZANONI, 2000). Assim, durante o processamento têxtil, a ineficiência no tingimento, mais precisamente na etapa de fixação do corante à fibra, resulta em grandes quantidades de resíduos sendo diretamente perdidos para os efluentes, e que conseqüentemente são lançados no ambiente aquático. A quantidade de corante perdido é dependente da classe de corante utilizado na aplicação das fibras, variando de 2% de perda quando se utiliza corantes básicos a 50% perdidos para corantes reativos (RAJAGURU *et al.*, 1999; McMULLAN *et al.*, 2001; KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004; GURAV *et al.*, 2011; MANSOUR *et al.*, 2012).

Os corpos d'água recebem efluentes com alta carga orgânica e demanda bioquímica de oxigênio, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, forte coloração e pouca biodegradabilidade. Dessa forma, o descarte de corantes em ecossistemas aquáticos é indesejável não somente por razões estéticas, mas porque muitos desses compostos contribuem significativamente para a poluição de recursos hídricos, por dificultarem a penetração dos raios solares sobre a água, afetando principalmente os processos de fotossíntese e oxigenação do corpo d'água, alterando os ciclos biológicos dos organismos aquáticos (KUNZ *et al.*, 2002; ROBINSON, CHANDRAN, NIGAM, 2002; PEREIRA, FREIRE, 2005; PRZYSTAŚ, ZABŁOCKA-GODLEWSKA, GRABIŃSKA-SOTA, 2012).

Além deste fato, estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azo corantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos, devido à presença ou produção de aminas aromáticas por esses compostos (CHUNG, CERNIGLIA, 1992, HOUK, 1992, RAJAGURU *et al.*, 1999,

JAGER, HAFNER, SCHNEIDER, 2004, UMBUZEIRO *et al.*, 2005a, UMBUZEIRO *et al.*, 2005b), o que coloca em risco a saúde humana, uma vez que os métodos convencionais de tratamento de efluentes e as Estações de Tratamento de Água são ineficientes na degradação do corante, assim como na remoção da coloração (KUNZ *et al.*, 2002; KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004; FRANCISCON *et al.*, 2012) e mutagenicidade dessas substâncias (OLIVEIRA *et al.*, 2010; VACCHI *et al.*, 2013).

Os corantes ftalocianinas também são potencialmente mutagênicos e de grande preocupação em relação à sua toxicidade provocada principalmente pela associação com metais, como cobre e níquel (MATTHEWS, BOTTOMLEY, PAVLOSTATHIS, 2009).

1.6 Avaliação ecotoxicológica

Tendo em vista a ineficiência do processo de tingimento têxtil, resultando na perda de corantes que alcançam o efluente industrial e, conseqüentemente contaminam o ambiente, este trabalho investigou a ecotoxicidade dos dois corantes Direct Black 38 (Figura 4A) e Reactive Blue 15 (Figura 4B), pertencentes a grupos distintos em relação ao modo de fixação à fibra e ao grupo cromóforo.

Esses corantes foram selecionados com o objetivo de avaliar se os diferentes grupos funcionais relacionados à cor, solubilidade e aplicação à fibra oferecem riscos sobre os diferentes ecossistemas, utilizando os *endpoints* que serão apresentados a seguir.

Essa parte do trabalho foi desenvolvida durante um estágio na Unidade de Toxicologia Experimental e Ecotoxicologia (UTOX), em Barcelona, na Espanha. A UTOX é uma unidade do Parc Científic de Barcelona, de reconhecida importância na análise de ecotoxicidade de compostos e que recebe o apoio da Universidade de Barcelona para atuar como um centro de pesquisa, inovação e serviços em Toxicologia, destinado ao setor público e privado. Essa unidade apresenta reconhecida importância na análise de ecotoxicidade de compostos.

A pesquisa ecotoxicológica determina o destino e os efeitos prejudiciais de contaminantes (orgânicos e inorgânicos) no ambiente, dependendo da fonte (ar, solo, água) e da natureza do toxicante (solubilidade, volatilidade, biodegradabilidade), além da rota de transferência (via de precipitação, lixiviação),

compartimentos expostos (sedimentos, água subterrânea) e dos alvos biológicos (ecossistemas, animais e humanos) (KAHRU, PÖLLUMAA, 2006).

1.6.1 Teste de toxicidade aguda com sementes

A fitotoxicidade é descrita como uma intoxicação de plantas vivas, pela absorção de substâncias tóxicas presentes no ambiente de crescimento e pelo acúmulo das mesmas no tecido do vegetal (ARAÚJO, MONTEIRO, 2005).

Uma maneira simples, sensível e rápida de avaliar o potencial tóxico de substâncias químicas para plantas é através de estudos toxicológicos utilizando sementes, mediante a avaliação do processo de germinação das sementes e desenvolvimento das raízes (ARAÚJO, MONTEIRO, 2005; BRITO-PELEGRINI *et al.*, 2009).

A germinação normalmente é reconhecida como um processo fisiológico, que inicia com a absorção de água pelas sementes, por embebição, em que ocorre a reidratação dos tecidos e, conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam no fornecimento de energia e nutrientes necessários para culminar as radículas e ocorrer o crescimento (BRITO-PELEGRINI *et al.*, 2009).

A análise da fitotoxicidade de compostos químicos utilizando o teste de germinação das sementes e desenvolvimento das raízes pode ser realizada com diferentes espécies vegetais, tais como, pepino, agrião, rúcula, tomate, brócolis, alface, rabanete, soja e trigo (ARAÚJO, MONTEIRO, 2005; SALVATORE *et al.*, 2008; BRITO-PELEGRINI *et al.*, 2009) e com diferentes substratos de crescimento, como papel de filtro ou ágar (SALVATORE *et al.*, 2008).

Como citado anteriormente, durante a etapa de germinação da semente e do desenvolvimento da raiz, ocorrem inúmeros processos fisiológicos, nos quais a presença de uma substância tóxica pode interferir negativamente, alterando a sobrevivência e o crescimento normal da planta (BRITO-PELEGRINI *et al.*, 2009; SOUZA, 2011).

A determinação do comprimento da radícula da semente permite ponderar o efeito tóxico provocado por uma substância química. Um composto tóxico pode não ser suficiente para inibir a germinação da semente, porém pode comprometer o processo de alongamento da radícula. Desta forma, a germinação das sementes e

desenvolvimento das raízes, constituem indicadores que se complementam no que se refere aos efeitos biológicos em organismos vegetais (SOUZA, 2011).

Em síntese, o bioensaio de toxicidade com sementes tem se mostrado uma ferramenta bastante promissora no biomonitoramento ambiental, devido ao baixo de custo, além de não necessitar de equipamentos sofisticados e de ambientes extremamente controlados para a sua execução.

Neste trabalho foi utilizado método com papel de filtro como substrato de crescimento para as sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*).

1.6.2 Teste de toxicidade aguda com *Eisenia foetida*

As minhocas são importantes membros do ecossistema terrestre e desempenham um papel importante na melhoria da estrutura e fertilidade do solo, uma vez que estão significativamente envolvidas na decomposição da matéria-orgânica e ciclagem de nutrientes (LANGDON *et al.*, 2003; KLOBUCAR *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). Estas características fazem das minhocas organismos atraentes para monitorar o impacto de contaminantes nos solos (LANGDON *et al.*, 2003).

Elas atuam como consumidores primários nas cadeias alimentares terrestres e como presas para muitos vertebrados, como as aves, por exemplo, proporcionando uma rota através da qual os contaminantes podem ser transferidos para os níveis tróficos superiores. Além disso, as minhocas apresentam uma elevada capacidade para acumular compostos tóxicos. A extensão da bioacumulação depende do tipo de substância e também das propriedades do solo. Esta é outra razão, que justifica a aplicação desses organismos como indicadores da qualidade do solo (LANGDON *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2012).

Há vários ensaios para a avaliação do potencial tóxico de substâncias químicas e de solo contaminado sobre as minhocas como, por exemplo, teste de imersão, de aplicação tópica, teste de alimentação forçada, em solo natural, em solo artificial e por contato com papel de filtro (WANG *et al.*, 2012), desempenhados com diferentes espécies de minhocas (*Aporrectodea rosea*, *Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus*, *Eisenia andrei*) (LANGDON *et al.*, 2003).

Neste trabalho foi utilizado o teste por contato em papel de filtro com minhocas adultas da espécie *Eisenia foetida*.

1.6.3 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

O gênero *Daphnia* é extensivamente usado como organismo teste em avaliações ecotoxicológicas, devido a sua ampla distribuição no ambiente aquático, alta sensibilidade a um grande número de contaminantes aquáticos, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, reprodução partenogenética (redução da variabilidade biológica) e ao rápido crescimento populacional (TATARAZAKO, ODA, 2007; GUTIERREZ, PAGGI, GAGNETEN, 2012). Além disso, esses microcrustáceos do zooplâncton ocupam uma posição importante na cadeia alimentar, uma vez que se alimentam do fitoplâncton e servem de alimento para peixes e outros predadores, o que os torna um elo crucial entre a produção primária e secundária (TATARAZAKO, ODA, 2007).

Alguns procedimentos padrões para ensaios ecotoxicológicos utilizando esse gênero como organismo-teste, recomendam espécies temperadas como a *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*. *Daphnia magna* são crustáceos de água doce, que medem cerca de 3,0 mm, vulgarmente conhecidas como pulgas d'água, são altamente sensíveis à agentes tóxicos e por isso são consideradas a espécie-teste recomendada pela OECD (Organization for Economic Cooperation and Development [OECD], 1997, 2004). Entretanto, a utilização de outras espécies é possível, desde que sua sensibilidade seja maior ou igual às espécies indicadas, como por exemplo, a *Daphnia similis*, muito utilizada no Brasil e que está intimamente relacionada a *Daphnia magna*, pertencendo ao mesmo subgrupo do subgênero *Ctenodaphnia* (BURATINI, BERTOLETTI, ZAGATTO, 2004).

No presente trabalho foi realizado o ensaio de toxicidade aguda empregando *Daphnia magna*, que se baseia na inibição da capacidade natatória dos organismos. O princípio do método é a exposição de indivíduos jovens por um período de 24 a 48 horas a várias diluições de uma amostra, após o qual é verificado a capacidade de imobilização dos organismos (OECD, 2004).

1.6.4 Ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish, também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra, é um teleósteo, de 3-4 cm de tamanho, tropical de água doce, nativo de rios do Sul da Ásia, pertencente à família dos Cyprinidae, à ordem dos Cypriniformes e a espécie *Danio rerio*. Entre as características do zebrafish, a mais marcante é o seu padrão

de listras pretas e brancas ao longo do corpo. Ele possui nadadeiras anal e caudal e, os machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas (LAWRENCE, 2007; SPENCE *et al.*, 2008; SCHOLZ *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, ensaios utilizando embriões e larvas do zebrafish (*Danio rerio*) têm atraído à atenção de toxicologistas como organismos modelo para estudos da toxicidade de compostos químicos em relação ao desenvolvimento desse vertebrado tanto para a avaliação do risco ambiental quanto humano (SCHOLZ *et al.*, 2008; CARLSSON *et al.*, 2013).

Algumas características têm contribuído para a popularidade do zebrafish entre a comunidade científica internacional como modelo experimental, são elas: o tamanho pequeno, a facilidade de manutenção em laboratório e de produção de grande número de embriões, que se desenvolvem fora do útero materno; a transparência dos ovos e larvas, que possibilita acompanhar o desenvolvimento do peixe e observar a presença de malformações; além de apresentar um curto ciclo de reprodução e alcançar a maturidade sexual em cerca de 3 meses. O genoma do zebrafish está completamente caracterizado e a similaridade genética aos humanos também oferece uma posição privilegiada desse organismo-teste na avaliação genética e toxicológica (KIMMEL *et al.*, 1995; LAWRENCE, 2007; SPENCE *et al.*, 2008; SCHOLZ *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008; HASSAN, MOUSSA, ABBOTT, 2011).

Adicionalmente, a atual legislação Européia (DIRECTIVE 2010/63/EU) sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos considera que os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish não precisam de regulamentação, uma vez que embriões e larvas que não alcançaram a alimentação exógena e, por isso não são considerados animais (DIRECTIVE 2010/63/EU; SCHOLZ *et al.*, 2008; TEIXIDÓ *et al.*, 2013). Assim, por razões éticas os testes com embriões de zebrafish têm sido propostos como uma alternativa para a substituição dos experimentos com animais adultos em pesquisas biomédicas, ambientais, toxicológicas e ecotoxicológicas (SCHOLZ *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2010; TEIXIDÓ *et al.*, 2013).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o risco da exposição dérmica a um corante proveniente de fibra têxtil tingida e extraída por lixiviação com suor sintético, empregando ensaios toxicogenéticos. Também foi objetivo geral do trabalho avaliar o potencial de corantes têxteis em induzir danos ambientais, empregando diversos ensaios ecotoxicológicos.

Para atingir este objetivo, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a genotoxicidade do corante Direct Black 38 original para fibroblastos e queratinócitos (HaCaT) de pele humana, utilizando o ensaio do cometa;
- Avaliar a mutagenicidade do corante Direct Black 38 original, utilizando o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, na presença e ausência de S9;
- Avaliar a citotoxicidade do corante Direct Black 38 original para fibroblastos de pele humana, utilizando o ensaio com Anexina V;
- Monitorar e quantificar a extração por lixiviação do corante Direct Black 38 da fibra tingida nas soluções de suor, utilizando técnicas cromatográficas;
- Determinar a condição de maior migração do corante Direct Black 38 da fibra tingida para o suor, em situações distintas de pH, tempo e temperatura de exposição;
- Avaliar a genotoxicidade do corante Direct Black 38 lixiviado das fibras têxteis no suor, utilizando o ensaio do cometa com fibroblastos e queratinócitos (HaCaT) de pele humana;
- Avaliar a mutagenicidade do corante Direct Black 38 lixiviado das fibras têxteis no suor, utilizando o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, na presença e ausência de S9;
- Avaliar a citotoxicidade do corante Direct Black 38 lixiviado das fibras têxteis no suor, utilizando o ensaio com Anexina V em fibroblastos de pele humana;
- Avaliar a ecotoxicidade dos corantes originais Direct Black 38 e Reactive Blue 15, utilizando os ensaios de toxicidade aguda com sementes, *Eisenia foetida* e *Daphnia magna*;

- Avaliar a capacidade dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 em induzir malformações em embriões de zebrafish (*Danio rerio*).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Corantes estudados

Neste trabalho foram avaliados os seguintes corantes:

- Direct Black 38 (Figura 4A): original e lixiviado no suor sintético.
 - ✓ Sinonímia: Chlorazol Black E
 - ✓ Fórmula molecular: $C_{34}H_{25}N_9Na_2O_7S_2$
 - ✓ Pureza $\geq 45\%$
 - ✓ Peso molecular: 781,73 g/mol
 - ✓ Número CAS: 1937-37-7
- Reactive Blue 15 (Figura 4B): original
 - ✓ Sinonímia: Turquoise Blue
 - ✓ Fórmula molecular: $C_{41}H_{19}ClCuN_{14}Na_4O_{14}S_5$
 - ✓ Pureza: 35%
 - ✓ Peso molecular: 1.282,96 g/mol
 - ✓ Número CAS: 12225-39-7

Os dois corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e avaliados por ensaios de ecotoxicidade. Já a análise toxicogenética foi realizada apenas com o corante Direct Black 38.

3.2 Métodos

3.2.1 Ensaios toxicogenéticos

A avaliação toxicogenética desse trabalho foi realizada apenas com o corante Direct Black 38 original e extraído por lixiviação com suor, já que o corante Reactive Blue 15 foi inicialmente testado por nosso grupo e apresentou resultados preliminares negativos para os ensaios do cometa em fibroblastos de pele humana e teste de AMES.

3.2.1.1 Ensaio do cometa utilizando fibroblastos de pele humana (NHDF) e queratinócitos humanos (HaCaT)

3.2.1.1.1 Cultura de fibroblastos de derme humana adulta (NDHF)

As culturas de fibroblastos de derme humana (Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF) foram obtidas da Lonza e mantidas em meio FBM (Fibroblast Basal Medium, Lonza), acrescido de insulina, soro bovino fetal, gentamicina/anfotericina-B e fator de crescimento (hFGF-B) e, incubadas em estufa a 5% de CO₂, 96% de umidade e 37°C, para permitir o crescimento em monocamada.

3.2.1.1.1.1 Soluções utilizadas:

- **Meio de Cultura:** o meio de cultura Fibroblast Basal Medium (FBM, 500 mL, Lonza) foi suplementado com 15% de soro bovino fetal, 0,5 mL hFGF-B, 0,5 mL de insulina, e 0,5 mL de gentamicina/anfotericina-B para uso.
- **PBS** (Phosphate Buffered Saline): foram dissolvidos 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na₂HPO₄) em água deionizada q.s.p. 1000 mL, sendo agitados até a completa solubilização. Foi corrigido o pH para 7,4 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a usualmente 0,1 M, mas em caso de necessidade foi utilizado concentrações maiores ou menores. A esterilização foi realizada por autoclavagem à 120°C por 30 minutos.
- **Tripsina-EDTA 0,1% (Sigma):** a tripsina é uma enzima proteolítica, que foi utilizada para o desprendimento das células dos frascos de cultura, através da degradação da matriz glicoproteica extracelular. Seu preparo foi realizado na proporção de 1:9 com PBS estéril em um frasco esterilizado. Homogeneizou-se e armazenou-se em geladeira.

3.2.1.1.1.2 Cultivo e manutenção dos fibroblastos

3.2.1.1.1.2.1 Descongelamento dos fibroblastos

Primeiramente, os criotubos com as células foram removidos do nitrogênio líquido e os fibroblastos foram ressuspensos em meio FBM suplementado no próprio criotubo, usando uma micropipeta. As células foram dispensadas

diretamente no frasco de cultura de 75 cm² contendo meio FBM suplementado e já estabilizado a 37°C. Os fibroblastos foram incubados em estufa a 5% de CO₂, 96% de umidade e 37°C, para permitir o crescimento em monocamada.

3.2.1.1.1.2.2 *Repique e manutenção dos fibroblastos*

As células foram coletadas por tripsinização, ou seja, o meio de cultivo foi descartado e as células lavadas uma vez com 10 mL de PBS (quando eram usados frascos de cultura de 150 cm² colocavam-se 15 mL de PBS e em frascos de 25 cm², colocavam-se 5,0 mL de PBS). Foram adicionados 5,0 mL de tripsina nos frascos de 75 cm² (em frascos de cultura de 25 cm² eram colocados 3,0 mL de tripsina, e em frascos de cultura de 150 cm², colocavam-se 10 mL de tripsina). A tripsina ficou em contato com as células na estufa à 37°C por 5 minutos e então foi inativada com 7,0 mL de meio de cultivo suplementado em cada frasco de 75 cm² (para frascos de cultura de 25 cm² colocavam-se 5,0 mL de meio suplementado e em frascos de cultura de 150 cm² colocavam-se 12 mL de meio suplementado). Em seguida, toda essa solução foi transferida para um tubo cônico estéril e centrifugada a 212 g (1500 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido com 1,0 mL de meio completo. Em seguida, 1,0 mL da suspensão de células foram colocados em um frasco de cultura de 150 cm² contendo 29 mL de meio suplementado. Os frascos foram mantidos em estufa à 37°C com 5 % de CO₂ e umidade.

3.2.1.1.1.2.3 *Congelamento dos fibroblastos*

O procedimento utilizado foi o mesmo do repique (tripsinização). Entretanto, o *pellet* foi ressuspendido com 3 mL de solução DMSO (10%) + soro bovino fetal. O conteúdo do tubo foi dividido para 3 tubos criogênicos (1 mL em cada) e deixados 15 minutos no gelo. Os tubos criogênicos foram deixados *overnight* no freezer à -80°C e mantidos congelados em nitrogênio líquido.

3.2.1.1.1.3 *Contagem das células para os ensaios*

As células foram tripsinizadas e o *pellet* ressuspendido com meio de cultivo. Após homogeneização, a câmara de *Newbauer* foi preenchida e foi feita a contagem

das células, com o objetivo de estimar a quantidade de suspensão celular apropriada para ser distribuída em cada poço da placa para cultura.

3.2.1.1.2 Cultura de queratinócitos humanos (HaCaT)

As culturas de queratinócitos humanos (HaCaT) foram gentilmente fornecidas pela Profa Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) suplementado com 10% de soro bovino fetal e, incubadas em estufa a 5% de CO₂, 96% de umidade e 37°C, para permitir o crescimento em monocamada.

3.2.1.1.2.1 Soluções utilizadas:

- **Meio de Cultura:** 9,61g de Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM - Gibco) foram dissolvidos em 500 mL de água destilada. Foram acrescentados 2,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 10 mL da solução de antibiótico-antimicótico (Gibco) e 10 mL de piruvato de sódio (Gibco) sendo completado o volume para 1 L com água destilada. O meio foi mantido sob agitação por 10 minutos para a completa dissolução e o pH corrigido para 7,2 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a usualmente 0,1 M. A esterilização foi realizada por filtração em membrana 0,22 µm. O meio foi então armazenado em frasco esterilizado na geladeira. Como os meios de cultivo não contêm substâncias mitogênicas, é necessária a adição de estimulantes de divisão, tais como o fator de crescimento presente no soro bovino fetal. Por esse motivo, antes de se iniciar o uso na cultura de HaCaT, foi adicionado 10% de SBF ao meio de cultivo (meio completo).
- **PBS:** preparado da mesma forma, como apresentado no item 3.2.1.1.1.1.
- **Trypsina-EDTA 0,1%:** preparado da mesma forma, como apresentado no item 3.2.1.1.1.1

3.2.1.1.2.2 Cultivo e manutenção dos queratinócitos

3.2.1.1.2.2.1 Descongelamento dos queratinócitos

Primeiramente, os criotubos com as células foram removidos do nitrogênio líquido e as células foram descongeladas. Os queratinócitos foram transferidos para

um tubo cônico estéril, no qual foram adicionados 9,0 mL de meio de cultivo (meio completo). Em seguida, as células foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a 212 g (1500 rpm), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspensionado com 1 mL de meio de cultivo. As células foram transferidas para o frasco de cultura de 75 cm² contendo 14 mL de meio de cultivo e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

3.2.1.1.2.2.2 Repique e Manutenção dos queratinócitos

As células foram coletadas por tripsinização, ou seja, o meio de cultivo foi descartado e as células lavadas uma vez com 10 mL de PBS (quando eram usados frascos de cultura de 150 cm² colocavam-se 15 mL de PBS e em frascos de 25 cm², colocavam-se 5,0 mL de PBS). Foram adicionados 5,0 mL de tripsina nos frascos de 75 cm² (em frascos de cultura de 25 cm² eram colocados 3,0 mL de tripsina, e em frascos de cultura de 150 cm², colocavam-se 10 mL de tripsina). A tripsina ficou em contato com as células na estufa a 37°C por cerca de 5 minutos. Após esse tempo, foi realizada a raspagem suave do frasco com um raspador estéril de células (cell scraper), a fim de remover as células aderidas. Então, a tripsina foi inativada com 7,0 mL de meio de cultivo completo em cada frasco de 75 cm² (para frascos de cultura de 25 cm² colocavam-se 5,0 mL de meio completo e em frascos de cultura de 150 cm² colocavam-se 12 mL de meio completo). Em seguida, toda essa solução foi transferida para um tubo cônico estéril e centrifugada a 212 g (1500 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado com 1,0 mL de meio completo. Em seguida, 1,0 mL da suspensão de células foram colocados em um frasco de cultura de 150 cm² contendo 29 mL de meio completo. Os frascos foram mantidos em estufa à 37°C com 5 % de CO₂ e umidade.

3.2.1.1.2.2.3 Congelamento dos queratinócitos

O procedimento utilizado foi o mesmo do repique. Entretanto, o *pellet* foi ressuspensionado com 3 mL de solução DMSO + meio completo + soro bovino fetal (10 mL de DMSO + 80 mL meio DMEM completo + 10 mL SBF). O conteúdo do tubo foi dividido para 3 tubos criogênicos (1 mL em cada) e deixados 15 minutos no gelo. Os tubos criogênicos foram deixados *overnight* em freezer à -80°C e mantidos congelados em nitrogênio líquido.

3.2.1.1.2.3 Contagem das células para os ensaios

As células foram coletadas por tripsinização e raspagem suave do frasco de cultura. O *pellet* foi ressuspenso em meio de cultivo e após homogeneização, a câmara de *Newbauer* foi preenchida para realizar a contagem de células, com o objetivo de estimar a quantidade de suspensão celular apropriada para ser distribuída em cada poço da placa para cultura.

3.2.1.1.3 Procedimento de ensaio

3.2.1.1.3.1 Soluções utilizadas:

- **Agarose normal 1,5%** (preparo das lâminas): 1,5 g de agarose ultra-pura foi misturada a 100 mL de água milli-Q e aquecida em microondas até ficar translúcida. Em seguida, foi colocada em banho-maria a 60°C para estabilizar a temperatura. Então, as lâminas foram mergulhadas na solução de agarose e secas ao ar livre.
- **Agarose LMP 0,5%** (agarose de baixo ponto de fusão): 500 mg de agarose LMP foram dissolvidos em 100 mL de água milli-Q usando aquecimento em microondas. Aliquotou-se 5 mL dessa solução em frascos de penicilina e armazenou-se em geladeira. No momento do uso, a solução de agarose foi derretida em microondas e colocada em banho-maria a 37°C até estabilizar a temperatura.
- **Solução de lise** (estoque): 146,1 g de NaCl (2,5 M), 37,2 g de EDTA (100 mM) e 1,2 g de Tris (10 mM) foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada. Usando o agitador magnético e pérolas de hidróxido de sódio NaOH, o pH foi ajustado para 10. Essa solução foi conservada na geladeira por 1 mês.
- **Solução de lise** (uso): Essa solução foi preparada 2 horas antes de iniciar o ensaio. Adiciona-se 4 mL de Triton X-100 (1%) e 40 mL de DMSO (10%) em q.s.p. 400 mL de solução de lise estoque. A solução foi armazenada em *coppling*, na geladeira e protegido da luz, até o momento de uso.
- **Solução de EDTA 200 mmol/L** (solução A): 14,89 g de EDTA foram misturados em 200 mL de água destilada e o pH acertado para 10 utilizando pérolas de NaOH. Essa solução foi conservada em geladeira por 2 semanas.
- **Solução de NaOH 10 mol/L** (solução B): Em banho de gelo, foram colocados 200 g de NaOH em 500 mL de água destilada. Essa solução foi preparada na capela de exaustão e conservada na geladeira ao abrigo da luz por 2 semanas.

- **Solução de Eletroforese** (pH > 13): Essa solução foi preparada no momento do uso. 10 mL da solução A (EDTA) e 60 mL da solução B (NaOH) foram dissolvidos em q.s.p. 2000 mL de água destilada gelada.
- **Solução de Neutralização** (pH 7,5): 48,5 g de Tris foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,5 utilizando ácido clorídrico (HCl) concentrado. Essa solução foi conservada na geladeira por 2 semanas.
- **Solução de coloração com Brometo de Etídeo** (20 µg/mL): 10 µL da solução de brometo de etídeo 10 mg/mL foram diluídos em 4990 µL de água destilada. Essa solução foi conservada à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

As concentrações escolhidas para análise do corante Direct Black 38 original pelo ensaio do cometa foram baseadas em Tice *et al.* (2000), que recomenda a concentração de 5 mg/mL (5000 µg/mL) como máxima e não citotóxica. Para tanto, realizou-se um ensaio de viabilidade celular, que será descrito abaixo, e assim, foram estabelecidas em: 0,1 µg/mL; 1,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 100,0 µg/mL e 700 µg/mL. Já as concentrações do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético basearam-se na quantificação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) (item 4.5) e foram estabelecidas em: 0,0059 µg/mL; 0,059 µg/mL; 0,59 µg/mL; 5,9 µg/mL. As mesmas concentrações do corante Direct Black 38 original e lixiviado foram testadas com queratinócitos (HaCaT), a fim de possibilitar as comparações entre os dois sistemas celulares.

O ensaio do cometa foi realizado com base no protocolo estabelecido por Tice *et al.* (2000) modificado por Tsuboy *et al.* (2007), para fibroblastos e de acordo com Petersen *et al.* (2000), queratinócitos. Em cada poço da placa para cultura foram semeados $2,0 \times 10^5$ fibroblastos / $3,0 \times 10^5$ queratinócitos e incubados por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ e 96% de umidade. Em seguida as culturas celulares foram tratadas com as soluções testes do corante Direct Black 38 original e lixiviado, e expostas por 3 horas. Após o período de incubação, o meio foi descartado, os poços foram lavados com PBS e as células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,1%, 5 min) suspensas e homogeneizadas em 1,0 mL de meio de cultura FBM para fibroblastos e DMEM para queratinócitos e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Foram adicionados cerca de 140 µL de agarose de baixo ponto de fusão à suspensão de células. Na sequência, esta suspensão foi transferida para lâminas

pré-cobertas com agarose de alto ponto de fusão, e estas cobertas por lamínulas e colocadas na geladeira por cerca de 15 minutos. Após isso, as lamínulas foram removidas e as lâminas colocadas na solução de lise por 2 horas para fibroblastos e 1 hora para queratinócitos. Terminada a lise, as lâminas foram colocadas em solução de eletroforese por 25 minutos para promover a desnaturação do DNA e após esse tempo realizou-se a separação eletroforética (300mA, 25V, 20 minutos). Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização por 15 minutos e em etanol absoluto por 5 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas com 65 μ L de brometo de etídio (20 μ g/mL) e examinadas em microscópio de fluorescência, utilizando o software *Comet IV* (Perceptive Instruments Ltd, UK). Para cada tratamento, duas lâminas foram preparadas em paralelo e os ensaios foram realizados em triplicata. Para a análise de dano ao DNA, foram contadas 50 células por lâmina, totalizando 100 células por tratamento. O parâmetro utilizado para avaliar a extensão do dano ao DNA de fibroblastos e queratinócitos foi o Tail Moment (TM), que representa a relação entre o comprimento e a intensidade da cauda (ou porcentagem de DNA na cauda) (PHILLIPS *et al.*, 1998). A Figura 6A mostra a imagem de um cometa analisado em software com as delimitações de cabeça e cauda. Já a Figura 6B ilustra um cometa de fibroblasto exposto ao peróxido de hidrogênio com alto potencial de dano ao DNA.

FIGURA 6. Cometa analisado em software. Coloração: SYBR green (A). Fotomicroscopia de fluorescência obtida nesse trabalho mostrando um fibroblasto com alto potencial de dano ao DNA. Visualização em aumento 40x. Coloração: brometo de etídeo (B).

As análises estatísticas das três repetições foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett ($\alpha=0,05$), com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 $\text{\textcircled{R}}$ (version 5.0,

GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Quanto maior o valor de tail moment das culturas tratadas comparado ao controle negativo, maior o dano genético.

Uma vez que danos no DNA estão associados com morte celular, paralelamente ao ensaio do cometa foi realizado o teste de exclusão por trypan blue a fim de assegurar a viabilidade das células (TICE *et al.*, 2000). Todos os testes foram acompanhados de controle positivo (peróxido de hidrogênio, H₂O₂, fibroblastos: 70 µM; queratinócitos: 60 µM durante 7 minutos de exposição) e negativos (PBS e solução resultante da extração por lixiviação de fibras controles, sem adição de corantes, obtidas no processo de tingimento sem ensaboamento e incubadas por 8 horas, com suor sintético em pH 8,0, à 42°C) e prosseguiu-se com o ensaio quando a viabilidade celular mostrava-se superior a 80%.

3.2.1.2 Avaliação da Viabilidade Celular

O teste de viabilidade celular com MTT se baseia na redução do sal tetrazolato (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) nas mitocôndrias das células metabolicamente ativas, o qual adquire uma coloração violeta, sendo solubilizado e analisado por espectrofotometria. Portanto, essa conversão somente ocorre nas células viáveis, sendo então possível determinar a proporção de células vivas após o tratamento (MOSMANN, 1983). O ensaio com MTT foi realizado para avaliar a viabilidade celular do corante original Direct Black 38, entretanto devido à forte coloração desse corante, ocorreu interferência na análise espectrofotométrica, inviabilizando a leitura (dados não mostrados). Sendo assim, esse ensaio foi substituído pelo teste de exclusão com o corante trypan blue, que será descrito abaixo.

3.2.1.2.1 Método de exclusão do corante Trypan Blue

O método de exclusão do corante trypan blue baseia-se no fato das células inviáveis, por não apresentar membrana celular íntegra, permitirem a incorporação do corante, ao passo que as células viáveis, cuja membrana está intacta, bloqueiam a permeabilidade ao corante. Desta forma, as células inviáveis coram-se em azul e as viáveis permanecem translúcidas. Ressalta-se que esta técnica detecta células inviáveis que possuem danos na membrana, mas pode não detectar células

inviáveis cujos danos afetam a adesão celular ou que podem progredir para a morte celular (SALVADORI, RIBEIRO, FENECH, 2003).

Foi feita uma diluição 1:1 com a suspensão de células (fibroblastos e queratinócitos) tratadas com o DB38 original e lixiviado e uma solução de *Trypan Blue* a 0,25% em PBS. Tal solução foi homogeneizada e retirou-se uma alíquota para preencher a câmara de *Newbauer* a fim de se fazer a contagem das células viáveis e não viáveis. Foram avaliadas 100 células de cada concentração em microscópico óptico e a porcentagem de células viáveis foi determinada.

3.2.1.3 Indução de morte celular em fibroblastos de pele humana

O ensaio de citotoxicidade com anexina V e iodeto de propídeo foi utilizado para avaliar a capacidade do corante Direct Black 38 original e lixiviado em induzir apoptose e/ou necrose em fibroblastos de pele humana. Este teste foi realizado de acordo com o protocolo de Vermes *et al.* (1995), utilizando anexina V conjugada com FITC (ficoeritrina) (BD Biosciences, San Diego, EUA) a 1% e iodeto de propídeo (PI, 5 µg/mL; Sigma, St Louis, EUA), ambos diluídos em um tampão de ligação (1x) (preparado a 10%, 10mM Hepes/NaOH; 140mM NaCl; 2,5mM CaCl₂; pH=7,4). As concentrações escolhidas para análise da citotoxicidade dos corantes foram baseadas no ensaio do cometa com fibroblastos de pele humana e ajustadas após a primeira repetição do ensaio.

Em cada poço da placa para cultura foram semeados $1,0 \times 10^5$ células e incubadas em meio FBM por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ e umidade. Após a incubação, as culturas de fibroblastos foram tratadas com as soluções testes do corante DB38 original (0,1 µg/mL; 10 µg/mL; 100 µg/mL; 250 µg/mL e 700 µg/mL) e lixiviado no suor (0,059 µg/mL; 0,59 µg/mL e 5,9 µg/mL), em duplicata e foram incubadas novamente a 37°C, 5% CO₂ e umidade por 3, 24 e 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de branco, controles positivos para marcar apoptose (estaurosporine, SSP, 15 µM) e necrose (peróxido de hidrogênio, H₂O₂, 8,8 mM) e negativo (PBS ou solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação). Após cada período de incubação, o meio foi descartado, os poços de cada duplicata foram lavados com PBS e as células foram tripsinizadas (Tripsina EDTA 0,1%, 5 minutos, a 37°C), ressuspensas e homogeneizadas em 1,0 mL de meio de cultura FBM e

centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas e os tubos colocados em banho de gelo. Adicionou-se 1,0 mL de PBS gelado a cada tubo, homogeneizou-se e centrifugou-se novamente a 1500 rpm e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos colocados em banho de gelo. As células de cada tratamento e controles foram ressuspensas com 100 µL de uma solução tampão contendo anexina V, exceto o branco que foi ressuspenso com 200 µL de PBS. O conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos próprios para análise em citômetro de fluxo e incubados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos. A anexina V foi utilizada para detectar a externalização da fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática durante o processo de apoptose. Por último foram adicionados 100 µL de uma solução tampão contendo iodeto de propídeo (PI) em cada tubo, exceto o tubo contendo o branco e estes foram colocados no citômetro de fluxo para análise. O iodeto de propídeo, em princípio, não penetra na membrana citoplasmática de uma célula viva, o que reflete a integridade da membrana. Entretanto, uma vez que a célula entrou em processo de necrose, este fluorocromo se liga a bases nitrogenadas do DNA, corando intensamente o núcleo da célula. Assim, a anexina é usada para detectar morte celular por apoptose e o PI detecta morte por necrose.

As análises estatísticas das três repetições foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett ($\alpha=0,05$), com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 ® (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.2.1.4 Ensaio com Salmonella/microssoma ou Teste de Ames

3.2.1.4.1 Meios de cultura e soluções:

- **Meio de Vogel Bonner (50x):** Composto por 10 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 91,43 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 500 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 175 g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 1L de água destilada morna. Após esterilização em autoclave o meio foi estabilizado a 55°C em banho-maria e estocado em refrigerador.
- **Solução de Glicose 10%:** 20 g de glicose foram dissolvidos em 200 mL de água destilada. Após esterilização o meio foi estabilizado a 55°C em banho-maria.

- **Solução de Ágar:** 15 g de ágar foram dissolvidos em 780 mL de água destilada. Após esterilização o meio foi estabilizado a 55°C em banho-maria.
- **Solução de Biotina e Histidina 0,5 mM:** 0,012 g de D-biotina (MM = 244,3 mol/L) e 0,0078 g de L-histidina (MM = 155 mol/L) foram dissolvidos à quente em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estocada em refrigerador.
- **Ágar Mínimo:** este meio de cultura é composto por 200 mL de solução de glicose (10%), 780 mL de solução de ágar, 20 mL de meio Vogel Bonner (50x) e 12 mL de solução de biotina e histidina (0,5 mM). Volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas.
- **Solução de Biotina 0,5 mM:** 0,012 g de D-biotina (MM = 244,3 mol/L) foram dissolvidos a quente em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estocada em refrigerador.
- **Solução de Histidina 26 mM:** 0,403 g de L-histidina (MM = 155 mol/L) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Em seguida esta solução foi autoclavada e estocada em refrigerador.
- **Caldo Nutriente:** 25 g do caldo nutriente foram dissolvidos a frio em 1L de água destilada. Volumes de 20 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave.
- **Ágar de Superfície:** 6 g de bacto ágar e 5 g de cloreto de sódio (NaCl) foram dissolvidos em 1L de água destilada. Volumes de 250 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave.
- **Ágar Nutriente:** 25 g de caldo nutriente e 15 g de ágar foram dissolvidos em 1L de água destilada. Este meio foi autoclavado, estabilizado em banho maria a 55°C e em seguida volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas.
- **Solução de Ampicilina 8 mg/mL:** 0,08 g de ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água morna. A esterilização desta solução foi feita por membrana filtrante de 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida a mesma foi armazenada em refrigerador em frasco escuro.
- **Mistura S9 – 4% v/v:** Cada 100 mL de mistura S9 é composto por 39,5 mL de água destilada estéril, 50 mL de tampão fosfato (0,2 M), 4 mL de NADP (0,1 M), 0,5 mL de glicose-6-fosfato (1,0 M), 2 mL da solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl₂ 0,4 M)

e 4 mL de fração S9, preparadas conforme descrito abaixo. Essa solução sempre foi preparada assepticamente, seguindo a ordem dada na adição dos reagentes. Após 3 horas a solução excedente foi descartada.

➤ **Tampão Fosfato 0,2 M (pH=7,4)**

Solução A: 2,84 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Solução B: 2,76 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Solução Final: volumes de 88 mL da solução A e 12 mL da solução B foram misturados e o pH foi ajustado para 7,4 com a solução A ou B. Após esterilização em autoclave o tampão foi estocado em frasco escuro na temperatura ambiente.

➤ **Solução de NADP 0,1 M:** 0,7654 g de NADP (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) foram dissolvidos em 10 mL de água destilada estéril. Esta solução foi esterilizada por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE) e armazenada a -20°C .

➤ **Solução de Glicose-6-fosfato 1,0 M:** 2,821 g de glicose-6-fosfato foram dissolvidos em 10 mL de água destilada estéril. Esta solução foi esterilizada por membrana filtrante de 0,45 μm (MILLIPORE) e armazenada a -20°C .

➤ **Solução de Sais (cloreto de magnésio (MgCl_2) 0,4 M; cloreto de potássio (KCl) 1,65 M):** 8,13 g de cloreto de magnésio (MgCl_2) e 12,3 g de cloreto de potássio (KCl) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave esta solução foi mantida em refrigerador.

➤ **Fração S9:** Este reagente é adquirido liofilizado, armazenado à -20°C e ressuspendido com 2,1 mL de água destilada estéril no momento do uso. A fração S9 é preparada a partir de microssomas de células de fígado de rato, tratado com o indutor enzimático Aroclor 1254 e separado por centrifugação a 9000g.

➤ **Água de Diluição:**

Solução A (g/L): 34 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram dissolvidos em 1L de água destilada.

Solução B (g/L): 81,1 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1L de água destilada.

Solução Final (v/v): 1,25 mL da solução A foram acrescentados à 5,0 mL da solução B e o volume completado para 1L com água destilada. 90 mL desta solução foram distribuídos em frascos de vidro com tampa de rosca e esterilizados em autoclave.

3.2.1.4.2 Preparo das culturas de uso rotineiro

As linhagens de *Salmonella typhimurium* obtidas da CETESB de São Paulo foram armazenadas permanentemente em freezer à -70°C, em ampolas com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de DMSO como agente crioprotetor. As culturas de uso rotineiro também foram mantidas em freezer à -70 C° em ampolas com 180 µL de cultura e 20 µL de DMSO.

As culturas de uso rotineiro foram preparadas a cada 6 meses e as características genéticas das linhagens (TA98 e TA100) foram previamente avaliadas como descrito: 100 µL de cultura permanente foram inoculados em 20 mL de caldo nutriente com 25 µg/mL de antibiótico ampicilina e, após 16 horas de incubação a 37°C e sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi estriada em placas de ágar nutriente para isolamento das colônias. Após incubação por 24 horas a 37°C, foram escolhidas ao acaso 5 colônias isoladas de cada linhagem, e estas, inoculadas em 5 mL de caldo nutriente, uma a uma. Após incubação por 16 horas a 37°C e agitação de 150 a 170 rpm, foram aliqüotados 180 µL da cultura e 20 µL de DMSO em ampolas para o uso rotineiro e 0,9 mL da cultura e 0,1 mL de DMSO para cultura permanente. As mesmas foram estocadas em freezer à -80°C. Cada cultura crescida nos 5 mL de caldo nutriente foi também inoculada, utilizando zaragatoas esterilizados, em placas de ágar mínimo com biotina, ágar mínimo com biotina e histidina, e ágar nutriente para avaliação das características genéticas. As características genéticas avaliadas estão descritas a seguir.

3.2.1.4.3 Avaliação das características genéticas das linhagens

Conforme mostrado na Tabela 1, as linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste estudo possuem características genéticas específicas. Para que os resultados dos testes sejam confiáveis, é necessário que estas características sejam confirmadas. Para tanto, foram realizados os testes descritos abaixo, conforme recomendado por Mortelmans e Zeiger (2000).

1) Dependência de histidina

A cultura crescida em caldo nutriente foi inoculada em placa de ágar mínimo com biotina e, a seguir, em placa de ágar mínimo com biotina e excesso de histidina. A dependência de histidina é confirmada pelo crescimento das linhagens em placa de ágar mínimo com biotina e excesso de histidina e ausência de crescimento na placa com ágar mínimo com biotina.

2) Mutação rfa

Discos de papel de filtro de 5 mm de diâmetro embebidos em 10 µL de solução cristal violeta 1% foram colocados no centro da placa de ágar nutriente inoculada. Após incubação por 24 horas a 37°C, as linhagens contendo esta mutação apresentavam um halo de inibição de no mínimo 14 mm ao redor do disco.

3) Plasmídeo pKM101

Com auxílio de uma alça de inoculação foram aplicadas cinco linhas de solução de ampicilina 8 mg/mL (uma linha para cada colônia a ser testada) em placa de ágar nutriente. A seguir as culturas crescidas nos 5 mL de caldo nutriente foram inoculadas sobre as linhas do antibiótico. Após incubação de 24 horas a 37°C, as linhagens contendo esta mutação apresentavam crescimento sobre a linha de antibiótico.

4) Deleção uvrB

Foram feitas cinco estrias (uma de cada colônia) numa placa de ágar nutriente. A seguir metade da placa foi coberta com gaze e irradiada com lâmpada germicida (ultravioleta 245 nm) de 15 watts a uma distância de 33 cm por 15 segundos. Após incubação por 24 horas a 37°C as linhagens que apresentavam esta mutação cresciam apenas no lado não irradiado (coberto) da placa.

- Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100 µL de cada cultura em 2,0 mL de ágar de superfície mantido em banho seco a 47°C, e vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. Cada cultura foi inoculada em triplicata.

A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 66 horas de incubação a 37°C e deveria estar dentro da faixa esperada para cada linhagem (Tabela 2). Vale salientar que a taxa de reversão espontânea pode variar de laboratório para laboratório (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

TABELA 2. Taxa de reversão espontânea em revertentes por placa esperada para a linhagem de *Salmonella typhimurium* usada neste trabalho.

Linhagem	Taxa de reversão esperada	Referências
TA98	25 – 75	(Umbuzeiro, Vargas, 2003)
TA 100	75 - 225	(Umbuzeiro, Vargas, 2003)

3.2.1.4.4 Protocolo de pré-incubação

Para o ensaio de mutagenicidade com *Samonella*, as concentrações do corante Direct Black 38 original foram escolhidas baseando-se em Mortelmans e Zeiger (2000), que recomenda testar 5000 µg/placa como dose máxima e solúvel no solvente. Portanto, as concentrações testadas foram: 0,5 µg/placa; 5,0 µg/placa; 10,0 µg/placa; 25,0 µg/placa; 50,0 µg/placa; 500,0 µg/placa; 2500 µg/placa e para possibilitar a comparação com o corante lixiviado, que está na unidade de µg/mL, tornaram-se essas: 5,0 µg/mL; 50,0 µg/mL; 100,0 µg/mL; 250,0 µg/mL; 500,0 µg/mL; 5000 µg/mL; 25000 µg/mL. Já as concentrações do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético, assim como no teste do cometa, basearam-se na quantificação realizada por HPLC-DAD (item 4.5) e são as seguintes: 0,00059 µg/mL; 0,0059 µg/mL; 0,059 µg/mL; 0,59 µg/mL; 5,9 µg/mL, a partir da maior concentração lixiviada no suor (5,9 µg/mL).

Foi utilizado o protocolo da pré-incubação desenvolvido por Maron e Ames (1983). Foram inoculadas 100 µL das culturas de TA98 e TA100 em 20 mL de caldo nutriente e crescidas por 16 horas a 37°C sob agitação de 150 a 170 rpm. Após crescimento as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste. Em tubos previamente esterilizados foram colocados 100 µL de cultura da linhagem (10⁹ células/mL), 100 µL da solução do corante original e lixiviado em diferentes concentrações e 500 µL de tampão fosfato 0,2 M para o ensaio na ausência de ativação metabólica ou o mesmo volume da mistura S9 para o ensaio na presença de ativação metabólica. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo foram adicionados 2,0 mL de ágar de superfície, a mistura foi então homogeneizada e vertida em placa de Petri com 20 mL de ágar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de

37°C ($\pm 0,5$). Os testes foram feitos em triplicata, usando dimetilsulfóxido (DMSO), como controle negativo para o corante Direct Black 38 original e suor sintético em pH 8,0, porém sem o aminoácido histidina, como controle negativo para o corante lixiviado. Como controles positivos foram usados 4-nitroquinolina-1-óxido (0,5 µg/placa) para as linhagens TA98 e TA100 na ausência de S9 e 2-aminoantraceno (2,5 µg/placa) para ambas linhagens na presença de S9. Depois desse tempo (66 horas) as colônias revertentes foram contadas e os resultados expressos em números de revertentes por placa, baseando-se na inclinação da curva dose-reposta. Os resultados foram expressos através da inclinação da reta nos gráficos e analisados por meio do software Salanal, um programa estatístico desenvolvido pelo Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, N.C. USA, usando o modelo de Bernstein, que utiliza tanto a ANOVA quanto a regressão linear (BERNSTEIN *et al.*, 1982; UMBUZEIRO, VARGAS, 2003).

3.2.1.4.5. Avaliação da viabilidade

Foram transferidos 100 µL da cultura crescida em caldo para um frasco contendo 90 mL de água de diluição (diluição -3). Esta mistura foi homogeneizada 30 vezes em ângulo de 45°. A seguir 100 µL desta solução foram adicionados em outro frasco com 90 mL de água de diluição (diluição -6) e o mesmo procedimento foi tomado. 100 µL desse último frasco foram adicionados em uma placa de ágar nutriente e espalhados através de uma Alça Drigalski fazendo movimentos circulares (diluição -7). Este ensaio foi feito em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a viabilidade deveria estar na faixa de $1,0 - 2,0 \times 10^9$ células/mL.

3.2.2 Tingimento da fibra têxtil

O tingimento de fibras de algodão com o corante Direct Black 38 foi realizado de acordo com Neves e Crespim (2000), com pequenas modificações. Vale ressaltar que esse protocolo é para tingimento reativo. Porém, devido às semelhanças entre as classes de corantes reativos e diretos com relação à solubilidade em água, afinidade por grupos hidroxilas da celulose, fixação melhorada do corante à fibra com a adição de álcali, pôde-se realizar o tingimento de fibras de algodão com o corante Direct Black 38 nas mesmas condições que o tingimento reativo.

Para tanto, foram realizados dois procedimentos de tingimento distintos, são eles:

3.2.2.1 Tingimento com adição de álcali e sem ensaboamento

Inicialmente, as amostras de tecido (3x6cm²) foram pesadas e os seguintes dados para o banho de tingimento foram calculados: R.B = 1:30 (relação do banho, dada em quilogramas da fibra pesada para litros de volume do banho com água destilada), 2% de corante, 70 g/L de cloreto de sódio (NaCl) e 15 g/L de carbonato de sódio (Na₂CO₃). Então, a água foi aquecida até uma temperatura de 50°C e adicionou-se o corante e o tecido agitando sempre (Figuras 7 e 8). Os demais reagentes foram adicionados de acordo com a Figura 7, ou seja, 10 minutos após a adição do corante e fibra, adicionou-se metade do NaCl e com 20 minutos adicionou-se a outra metade. Após 40 minutos do início, adicionou-se o Na₂CO₃ calculado e fez-se o ajuste do pH = 11 com hidróxido de sódio (NaOH). O tecido ainda foi mantido no banho de tingimento por cerca de 30 minutos após ajustar o pH para alcalino (pH=11) (Figuras 7 e 8C). Após o tingimento lavou-se o tecido por três minutos com água corrente (Figura 7).

FIGURA 7. Gráfico das etapas do tingimento com corante Direct Black 38.

FIGURA 8. Tingimento das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 a temperatura de 50°C (A). Tingimento das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 e o controle (branco) antes da adição do álcali (B). Tingimento das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 e o controle (branco) após a adição do álcali (C).

3.2.2.2 Tingimento completo (com adição de álcali e ensaboamento)

No tingimento completo (Figura 9), todas as etapas descritas acima foram repetidas, porém outras foram adicionadas a fim de realizar o ensaboamento do tecido. Para isso, lavou-se as fibras tingidas por cinco minutos em água à 60°C e para o ensaboamento preparou-se um banho com 0,6 g/L de Resiwash AC, fornecido pela Resinac Indústrias Químicas, que atua como dispersante e defloculante para lavagem de tecidos tingidos com corantes. Colocou-se o tecido no banho por 15 minutos à temperatura de fervura que depois foi lavado por três minutos à 60 °C e mais três minutos à frio (Figura 9C).

Dessa forma, ambos os tingimentos (com e sem ensaboamento) foram realizados por processos descontínuos (ou por esgotamento) e utilizaram o cloreto de sódio (NaCl), como substância responsável pela migração do corante do banho de tingimento para a fibra de algodão, a fim de promover a montagem. Também foi realizada a adição de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e ajuste do pH para alcalino

(pH=11) com pérolas de NaOH, para possibilitar a reação química e assim, fixar o corante.

Durante todos os processos de tingimentos com o corante Direct Black 38, foi inserida uma amostra controle (branco), em que todas as etapas do tingimento foram realizadas, exceto a adição do corante (Figuras 8 e 9).

FIGURA 9. Tingimento completo das fibras de algodão com o corante Direct Black 38 e o controle (branco) antes e após a adição do álcali (A,B, respectivamente). Ensaboamento das fibras de algodão tingidas com o corante Direct Black 38 e o branco, em banho com o dispersante e defloculante Resiwash AC (C).

3.2.3 Síntese dos três tipos de suor: ácido, básico e neutro

De acordo com a literatura, situações de transpiração intensa podem acarretar a migração do corante presente no tecido e subsequente penetração na pele (MEINKE *et al.*, 2009). Sendo assim, três diferentes formulações de suor sintético foram preparadas de acordo com *International Standard Organization* (ISO105-E04-2008E) e *British Standard* (BS EN1811-1999), para fornecer uma variação no pH (5,5; 6,5 e 8,0) (KULTHONG *et al.*, 2010), como apresentado na Tabela 3. Para ajustar o pH em 5,5; 6,5 e 8,0 foi utilizado hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

TABELA 3. Composição química do suor sintético.

Composição Química			Concentração (% p/v)		
			pH 5,5	pH 6,5	pH 8,0
L-histidina	monoclorada	monohidratada	0,05		0,05
(C ₆ H ₉ O ₂ N ₃ .HCl. H ₂ O)					
Cloreto de sódio (NaCl)			0,5	1,08	0,5
Fosfato de sódio bibásico anidro (Na ₂ HPO ₄)					0,2
Fosfato de sódio monobásico monohidratado			0,22		
(NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)					
Ácido láctico (C ₃ H ₆ O ₃)				0,12	
Uréia (CH ₄ N ₂ O)				0,13	

3.2.4 Extração por lixiviação do corante da fibra tingida no suor.

Após o tingimento sem ensaboamento e completo das fibras de algodão com o corante Direct Black 38, foi avaliada a migração desse corante para as soluções de suor sintético, após 2, 8 e 12 horas de exposição da fibra nas temperaturas 37°C e 42°C, simulando uma situação de temperatura corporal normal e temperatura de transpiração. Para isso, as fibras tingidas foram pesadas e adicionadas em uma proporção de 1:50 com o agente extrator, de acordo com Meinke *et al.* (2009) e Kulthong *et al.* (2010), ou seja, 20 mg de tecido/mL de suor sintético nos três diferentes pH (5,5; 6,5 e 8,0). A incubação das amostras ocorreu durante 2, 8 e 12 horas e em 37°C e 42°C. Todos os processos de extração por lixiviação com o corante Direct Black 38 foi realizado com uma amostra controle (branco), ou seja, a fibra de algodão correspondente ao controle do processo de tingimento com e sem ensaboamento, também foi incubada nas soluções de suor sintético com diferentes pH (5,5; 6,5 e 8,0) por 2, 8 e 12 horas à 37°C e 42°C (Figura 10).

FIGURA 10. Fibras de algodão referentes ao controle (branco) do tingimento (a) e fibras tingidas com o corante Direct Black 38 sem ensaboamento (b). Etapa de extração por lixiviação das fibras tingidas com corante Direct Black 38 (sem ensaboamento e completo) e dos controles no suor sintético nos diferentes pH (5,5; 6,5 e 8,0), tempos (2, 8 e 12 horas) e temperaturas (37°C e 42°C) de extração.

3.2.5 Monitoramento e quantificação do corante Direct Black 38 lixiviado no suor nas múltiplas condições, por meio de análise cromatográfica.

Após cada período de incubação (2, 8 e 12 horas) das fibras de algodão tingidas com o corante Direct Black 38 e controles nas diferentes condições de pH do suor sintético extrator (5,5; 6,5 e 8,0) e temperaturas de extração (37°C e 42°C), as soluções lixiviadas foram coletadas e submetidas a análises cromatográficas por HPLC-DAD. Esta última etapa foi realizada no Instituto de Química da UNESP de Araraquara em colaboração com a Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

3.2.5.1 Extração em fase sólida das amostras lixiviadas no suor sintético.

Para possibilitar a análise por HPLC-DAD da quantidade de corante lixiviada nas soluções de suor sintético em cada condição estudada, tornou-se necessário remover a maior quantidade de sal presente nas amostras. O método escolhido foi a extração em fase sólida utilizando um cartucho Strata-X 33u Polymeric Reversed Phase (200mg/3mL - Phenomenex), sendo realizada primeiramente a ativação (3

mL de metanol) e a limpeza (3 mL de H₂O) dos cartuchos, seguida de interação com o corante presente em 3 mL da amostra, extração do sal das amostras (3 mL de H₂O) e finalmente 3 mL de ACN/H₂O (50:50) para eluir o corante do cartucho. A amostra eluída foi então seca sob atmosfera de N₂ e ressuspensa em 3 mL de água.

3.2.5.2 *Análise cromatográfica das amostras lixiviadas no suor sintético.*

A quantificação do corante Direct Black 38 lixiviado pelo suor nas múltiplas amostras foi realizada por meio de análise cromatográfica por HPLC-DAD (Shimadzu SCL-10AVP; coluna Luna Phenomenex de 250x4,6 mm; d.i.5 µm; fluxo de 1,0 mL/min). O volume de injeção foi de 10 µL, a temperatura do forno 40°C e a concentração da solução 1x10⁻⁴ mol L⁻¹.

3.2.6 *Ensaio ecotoxicológicos*

A avaliação ecotoxicológica desse trabalho foi realizada na Unidade de Toxicologia Experimental e Ecotoxicologia (UTOX-PCB), em Barcelona, na Espanha com a colaboração dos senhores Joaquin de Lapuente e Miquel Borràs. Todos os ensaios ecotoxicológicos foram baseados nas regulamentações da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) ou da Environmental Protection Agency (US EPA).

3.2.6.1 *Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*)*

A sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*) foram obtidas comercialmente, separadas e lavadas em béquer com água destilada. As sementes danificadas foram descartadas. O teste de toxicidade aguda com sementes foi realizado de acordo com Ecological Effects Test Guideline - Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test (OPPTS 850.4200), desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental (US EPA, 1996) com algumas adaptações a fim de avaliar os riscos dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 para o ambiente.

Em cada placa de Petri previamente esterilizada foram colocados discos de papel de filtro Whatman número 1 (5 cm de diâmetro). Um volume de 2 mL das

soluções de corantes foi utilizado para umedecer toda a extensão do papel tendo o cuidado de evitar a formação de bolsas de ar e assim possibilitar a saturação do papel. Em seguida cada placa recebeu 10 sementes por espécie vegetal uniformemente distribuídas, posicionadas com 1,0 cm de distância cada uma para permitir o adequado meio para o crescimento. Todos os testes foram realizados em triplicata e na presença de controles negativo (água destilada) e positivo (sulfato de zinco; 3,5 mg/L) (Figura 11). As sementes de cada espécie testada foram expostas a 5 concentrações dos corantes DB38 e RB15 escolhidas em série geométrica de 2 (62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg/L), de acordo com a OPPTS 850.4200, da EPA. As placas de Petri assim preparadas, foram fechadas com tampa, identificadas e incubadas em estufa à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 120 horas, na ausência de luz. Durante o período de germinação em estufa o papel se manteve úmido, não sendo necessário realizar o método semi-estático. Após a incubação, as placas foram observadas em relação à germinação das sementes (contagem de sementes germinadas) e ao crescimento das raízes (medição do comprimento da radícula de cada plântula formada) e comparadas com os respectivos controles negativos, obedecendo o critério de validação, no qual 80% das sementes do controle negativo devem germinar e ter pelo menos 5 mm de protrusão radicular.

As análises estatísticas das três repetições foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett ($\alpha=0,05$), com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 ® (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

FIGURA 11. Desenvolvimento das sementes de pepino (*Cucumis sativus*) após 120 horas de incubação com sulfato de zinco - controle positivo (A) e água destilada - controle negativo (B).

3.2.6.2 Teste de toxicidade aguda com *Eisenia foetida*

Os ensaios de toxicidade aguda com minhocas *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) foram conduzidos pelo método de contato direto em papel filtro, recomendado OECD Guideline 207 (1984). Neste teste são utilizadas apenas *E. foetida* adultas com clitelo bem desenvolvido e com peso de $0,22 \pm 0,07$ g após esvaziamento do conteúdo intestinal por 3 horas de repouso em papel filtro úmido. Após a pesagem, as minhocas foram colocadas em tubos (3x8 cm) revestidos com papel de filtro Whatman número 1 umedecido com 1,0 mL da solução de cada concentração dos corantes DB38 e RB15 (0,1; 1,0; 10; 100; 1000 mg/L) e com os controles negativo (água destilada) e positivo (sulfato de zinco; 6 mg/mL). As concentrações foram determinadas pela OECD Guideline 207 (1984) e para cada dose testada, foram utilizadas 10 minhocas. Os tubos foram vedados com parafilme, com aberturas para permitir a circulação de ar e incubados por 48 horas à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, na ausência de luz. Após o período de incubação, observou-se a porcentagem de mortalidade dos animais em cada concentração dos corantes e controles, a fim de estimar a concentração capaz provocar 50% de mortes no sistema experimental (DL_{50}).

3.2.6.3 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

3.2.6.3.1 Soluções

- Água reconstituída para cultivo e diluição

Solução-estoque A:

11,76 g de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1L de água processada (água com condutividade menor que $10 \mu\text{S}/\text{cm}$, após tratamento por destilação, deionização ou osmose reversa).

Solução-estoque B:

0,23 g de cloreto de potássio (KCl) foram dissolvidos em 1L de água processada.

Solução-estoque C:

4,93 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1L de água processada.

Solução-estoque D:

2,59 bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foram dissolvidos em 1L de água processada.

Para preparar a água reconstituída foram adicionados 25 mL de cada solução-estoque (A, B, C e D) em q.s.p. 1 L de água processada. Essa solução final deveria ter o pH na faixa de 6,0 a 9,0, dureza total, representada pelo teor de CaCO_3 , entre 140 e 250 mg/L e concentração de oxigênio dissolvido $\geq 3,0$ mg/L.

3.2.6.3.2 *Organismo-teste*

Os organismos (15 organismos/L) foram mantidos a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, sob 16:8h luz:escuro, alimentadas diariamente com algas 3×10^6 células de *Chlorella sp.* para cada microcrustáceo por dia.

3.2.6.3.3 *Procedimento de ensaio*

O teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foi desenvolvido de acordo com OECD Guideline 202 (2004), com algumas modificações. Neonatos de *D. magna* com idade inferior a 24 horas foram colocados em tubos de vidro contendo 10 mL das soluções dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15, nas seguintes concentrações: 250, 500, 750 e 1000 mg/L expostos por 48 horas, com pH entre 6 e 9. Essas doses foram determinadas em ensaios preliminares. O solvente dos corantes foi utilizado como controle negativo. Para cada concentração testada foram expostos 5 neonatos e em duplicata. Os ensaios foram conduzidos em câmara climatizada com temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16:8h luz:escuro. Como critério de validação, após as 48 h foram observados os seguintes parâmetros: pH, teor de oxigênio e temperatura dos controles e das soluções dos corantes e mortalidade do grupo controle negativo, que deve ser inferior a 10%.

O efeito observado nesse teste foi a imobilidade dos organismos. Os neonatos que não apresentavam movimentação em um intervalo de 15 segundos, após agitação suave do tubo foram considerados imóveis (mesmo se ainda fossem capazes de movimentar as antenas) (OECD, 2004). A CE_{50} foi determinada como a concentração estimada para imobilizar 50% dos neonatos após 48 horas. Os valores de CE_{50} foram calculados pelo método de análise Probit.

3.2.6.4 Teste de toxicidade com zebrafish (*Danio rerio*)

3.2.6.4.1 Soluções

- Água reconstituída para cultivo e diluição

Solução-estoque A:

11,76 g de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1L de água processada (água com condutividade menor que $10 \mu\text{S}/\text{cm}$, após tratamento por destilação, deionização ou osmose reversa).

Solução-estoque B:

0,23 g de cloreto de potássio (KCl) foram dissolvidos em 1L de água processada.

Solução-estoque C:

4,93 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1L de água processada.

Solução-estoque D:

2,59 bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foram dissolvidos em 1L de água processada.

Para preparar 40 L de água reconstituída foram adicionados 1L de cada solução-estoque (A, B, C e D) em 36 L de água processada. Essa solução final deveria ter o pH na faixa de 6,0 a 9,0.

3.2.6.4.2 Manutenção do zebrafish e aquisição dos ovos

Os peixes adultos machos e fêmeas de zebrafish (*Danio rerio*) foram mantidos em aquário com água reconstituída, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro:escuro de 14:10h e alimentados com ração comercial e camarão de água salgada. Para aquisição dos ovos, no dia anterior a desova, foram colocados em outro aquário, peixes macho e fêmea na proporção de 2:1, plantas artificiais, indispensáveis para o acasalamento dos animais, fixadas em bolas de vidro e um cesto para a coleta dos ovos. O acasalamento era iniciado logo após a iluminação súbita do aquário na manhã seguinte. Cerca de 30 minutos após a desova, os ovos foram coletados e transferidos para uma placa Petri para serem lavados com água reconstituída e diluída em 1:5 com água deionizada. Todos os ovos foram analisados em microscópio de dissecação (SMZ-168, Motic) e os não-fertilizados foram

descartados. Para os experimentos, foram selecionados ovos que alcançaram o estágio de blástula.

3.2.6.4.3 Procedimento do ensaio

O método utilizado foi baseado na OECD 212 (1998) com modificações. Após a coleta do ovos fertilizados, esses foram distribuídos em placas para cultura com 24 poços, dispostos individualmente em poços com 2,0 mL de cada concentração da solução dos corantes Direct Black 38 (1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 mg/L), Reactive Blue 15 (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L) assim como para os controles negativo (água reconstituída) e positivo (3,4-dicloroanilina; 3,7 mg/L). Os experimentos foram realizados em triplicata e cada réplica foi constituída por 12 embriões para o controle negativo e 10 embriões para cada concentração testada dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 e controle positivo. As concentrações dos corantes foram determinadas de acordo com a OECD 212 (1998) e ajustadas com base nos resultados preliminares.

As placas foram incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, em fotoperíodo de 14:10 h claro:escuro e o desenvolvimento dos embriões e larvas de zebrafish foram avaliados em 4, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 hpf, utilizando um microscópio invertido (SMZ-168, Motic) e os seguintes indicadores: malformações em saco vitelino, falhas na inflação da bexiga natatória, edema pericardial, deformidades no esqueleto e a não ruptura da membrana do ovo. O número de ovos mortos foi observado até 72 horas pós-fertilização e a mortalidade foi identificada pela coagulação dos ovos, irregularidades na da cauda, assim como, a perda de batimentos cardíacos.

As análises estatísticas das três repetições foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett ($\alpha=0,05$), com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 ® (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação toxicogenética do corante Direct Black 38 antes e após a extração por lixiviação de fibras de algodão tingidas.

4.1.1 Avaliação da genotoxicidade do corante Direct Black 38 original utilizando o teste do cometa com fibroblastos de pele humana.

A Figura 12 mostra o efeito do corante Direct Black 38 original sobre o DNA de fibroblastos de pele humana, assim como a viabilidade celular após 3 horas de exposição. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os valores de *tail moment* das doses testadas e o controle negativo, o que significa que o corante testado não induziu danos ao DNA de fibroblastos nas concentrações e condições testadas.

Conforme dito anteriormente, ensaios com *Trypan Blue* foram realizados paralelamente ao ensaio do cometa a fim de analisar a viabilidade celular. Para todas as doses testadas, a viabilidade foi superior a 80%, como mostra a Figura 12.

FIGURA 12. Efeito do corante Direct Black 38 original sobre o DNA, observado pelo ensaio do cometa e a viabilidade celular de fibroblastos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. ** $p < 0,05$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: controle negativo, PBS; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio 70 µM, controle positivo.

4.1.2 Avaliação da genotoxicidade do corante Direct Black 38 original utilizando o teste do cometa com queratinócitos de pele humana.

Para permite uma melhor correlação dos possíveis efeitos genotóxicos do corante Direct Black 38 original para os seres humanos, adicionou-se mais um tipo de cultura celular proveniente de pele humana, os queratinócitos HaCaT, facilitando a extrapolação de resultados.

A Figura 13 mostra o efeito do corante Direct Black 38 original sobre o DNA de queratinócitos humanos (HaCaT), assim como a viabilidade celular após 3 horas de exposição. Para este tipo celular, também não observamos resultados positivos, considerando que não houve diferenças estatísticas significativas entre os valores de *tail moment* das doses testadas e o controle negativo

Assim como no teste com fibroblastos, os ensaios com *Trypan Blue* foram realizados paralelamente ao ensaio do cometa a fim de analisar a viabilidade celular das HaCaT. Para todas as doses testadas, a viabilidade foi superior a 80%, como mostra a Figura 13

FIGURA 13. Efeito do corante Direct Black 38 original sobre o DNA, avaliado pelo ensaio do cometa e a viabilidade celular de queratinócitos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. *** $p < 0,01$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: controle negativo, PBS; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio 60 µM, controle positivo.

4.1.3 Avaliação da citotoxicidade do corante Direct Black 38 original utilizando o ensaio com Anexina V e Iodeto de Propídeo com fibroblastos de pele humana.

A Figura 14 mostra o resultado do ensaio de indução de morte em fibroblastos de pele humana provocada pelo corante Direct Black 38 original após 3, 24 e 48 horas de exposição.

FIGURA 14. Efeito do corante Direct Black 38 original na viabilidade dos fibroblastos de pele humana após 3 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de incubação. CN: controle negativo (PBS); SSP: estaurosporina 15 µM, controle positivo de apoptose; H₂O₂: peróxido de hidrogênio 8,8 mM. Resultado de três repetições realizadas em duplicata. ** $p<0,05$ e *** $p<0,01$ estatisticamente diferentes dos respectivos controles negativos.

Nossos resultados mostraram que o corante Direct Black 38 original foi capaz de induzir necrose de fibroblastos de pele humana apenas a partir da concentração de 250 µg/mL, após 48 horas de exposição.

4.1.4 Avaliação da mutagenicidade do corante Direct Black 38 original utilizando o Ensaio com *Salmonella/microsoma*.

Na avaliação da mutagenicidade do corante Direct Black 38 original, as duas linhagens testadas, na presença de ativação metabólica exógena (S9) apresentaram respostas positivas, ou seja, após ser metabolizado pelas enzimas do citocromo P-450, este composto é capaz de induzir mutações de ponto tanto por deslocamento do quadro de leitura como por substituição de pares de bases, tipos de danos detectados pelas linhagens TA98 e TA100, respectivamente. De acordo com a Figura 15, a linhagem TA98 na presença de S9 apresenta potência mutagênica (2,5 revertentes/ μg) superior a da TA100 (0,1 revertentes/ μg).

FIGURA 15. Curva dose-resposta para o corante Direct Black 38 original testado com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na presença e ausência de ativação metabólica exógena (S9). Os números entre parênteses foram gerados pelo modelo de Bernstein *et al.* (1992), e representam a potência mutagênica do composto expresso em revertentes por μg . ** $p < 0,05$ estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles negativos (DMSO).

4.1.5 Monitoramento e quantificação do corante Direct Black 38 lixiviado no suor nas múltiplas condições, por meio de análise cromatográfica.

As Figuras 16 e 17 mostram o perfil de extração por lixiviação do corante original Direct Black 38 no suor sintético nas diversas condições testadas (tipo de tingimento, pH, temperatura e tempo de extração), obtidas por análise cromatográfica.

Esta etapa do trabalho foi realizada no Instituto de Química da UNESP de Araraquara em colaboração com a Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

As Figuras 16 e 17 (A) mostram a diferença na taxa de migração do corante para a solução de suor no processo de tingimento sem ensaboamento à 37°C e 42°C, enquanto que nas Figuras 16 e 17 (B), as fibras foram ensaboadas (processo de tingimento completo). Podemos observar claramente que nas situações sem ensaboamento houve uma maior migração do corante para as soluções sintéticas de suor (Figuras 16A e 17A).

FIGURA 16. Perfil de extração por lixiviação do corante Direct Black 38 de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 37°C.

FIGURA 17. Perfil de extração por lixiviação do corante Direct Black 38 de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 42°C.

Esse resultado também pode ser confirmado pela análise da Tabela 4, que indica que as maiores concentrações do corante Direct Black 38 lixiviado foram obtidas a partir das fibras tingidas sem a etapa de ensaboamento, especialmente quando foram empregadas as soluções sintéticas de suor alcalino (pH 8,0) à 42°C, variando de 3,18 a 5,90 mg/L, nessas condições.

TABELA 4. Concentrações do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento e completo, utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH, tempos e temperaturas de extração. A seta indica a situação em que houve a maior taxa de migração do corante para a solução de suor sintético.

N	Nome				Equação da Reta	C (mg.L ⁻¹)
1	DB38	2 h	37°C	pH 5,5 com ensab.	A=1162,5+2,19x10 ⁹ C	0,42
2				pH 6,5 com ensab.	A=817,33+1,71x10 ⁹ C	0,37
3				pH 8,0 com ensab.	A=3059,10+2,46x10 ⁹ C	0,97
4				pH 5,5 sem ensab.	A=3194,17+2,13x10 ⁹ C	1,17
5				pH 6,5 sem ensab.	A=2752,31+2,67x10 ⁹ C	0,81
6				pH 8,0 sem ensab.	A=8863,41+2,71x10 ⁹ C	2,56
7			42°C	pH 5,5 com ensab.	A=2343,00+1,80x10 ⁹ C	1,02
8				pH 6,5 com ensab.	A=826,67+1,95x10 ⁹ C	0,33
9				pH 8,0 com ensab.	A=2435,33+1,86x10 ⁹ C	1,02
10				pH 5,5 sem ensab.	A=4712,50+2,56x10 ⁹ C	1,44
11				pH 6,5 sem ensab.	A=6426,80+2,72x10 ⁹ C	1,85
12				pH 8,0 sem ensab.	A=8934,67+2,02x10 ⁹ C	3,46
13		8 h	37°C	pH 5,5 com ensab.	A=3031,80+2,46x10 ⁹ C	0,96
14				pH 6,5 com ensab.	A=2561,54+2,43x10 ⁹ C	0,82
15				pH 8,0 com ensab.	A=3489,52+2,53x10 ⁹ C	1,09
16				pH 5,5 sem ensab.	A=4040,38+2,79x10 ⁹ C	1,13
17				pH 6,5 sem ensab.	A=7437,91+2,83x10 ⁹ C	2,05
18				pH 8,0 sem ensab.	A=11514,32+2,88x10 ⁹ C	3,12
19			42°C	pH 5,5 com ensab.	A=1228,67+2,40x10 ⁹ C	0,40
20				pH 6,5 com ensab.	A=1194,33+2,04x10 ⁹ C	0,46
21				pH 8,0 com ensab.	A=4197,36+2,71x10 ⁹ C	1,21
22				pH 5,5 sem ensab.	A=10910,17+2,25x10 ⁹ C	3,79
23				pH 6,5 sem ensab.	A=8578,17+2,69x10 ⁹ C	2,49
24				pH 8,0 sem ensab.	A=20526,95+2,72x10 ⁹ C	5,90
25		12h	37°C	pH 5,5 com ensab.	A=2354,00+2,21x10 ⁹ C	0,83
26				pH 6,5 com ensab.	A=1614,51+2,49x10 ⁹ C	0,51
27				pH 8,0 com ensab.	A=4091,67+2,42x10 ⁹ C	1,32
28				pH 5,5 sem ensab.	A=9208,98+2,73x10 ⁹ C	2,64
29				pH 6,5 sem ensab.	A=8109,33+2,73x10 ⁹ C	2,32
30				pH 8,0 sem ensab.	A=12994,67+2,79x10 ⁹ C	3,64
31			42°C	pH 5,5 com ensab.	A=1021,72+2,73x10 ⁹ C	0,29
32				pH 6,5 com ensab.	A=1508,99+2,66x10 ⁹ C	0,44
33				pH 8,0 com ensab.	A=3734,83+2,20x10 ⁹ C	1,33
34				pH 5,5 sem ensab.	A=13470,16+2,80x10 ⁹ C	3,76
35				pH 6,5 sem ensab.	A=11663,37+2,81x10 ⁹ C	3,24
36				pH 8,0 sem ensab.	A=11574,15+2,84x10 ⁹ C	3,18

Essa maior eficiência na migração do corante para o suor pôde ser visivelmente observada, como mostra a Figura 18, na qual nota-se maior intensidade da cor dos extratos obtidos com as fibras tingidas sem o processo de ensaboamento em relação ao tingimento completo.

FIGURA 18. Comparação da intensidade de cor dos extratos obtidos por lixiviação das fibras tingidas sem a etapa de ensaboamento (A) e com tingimento completo (B) no suor sintético.

As Figuras 19 e 20 mostram a porcentagem de corante Direct Black 38 extraído em cada solução de suor, nas diversas condições testadas (tingimento, pH, temperatura e tempo de extração).

FIGURA 19. Porcentagem de corante Direct Black 38 lixiviado de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 37°C.

FIGURA 20. Porcentagem de corante Direct Black 38 lixiviado de fibras de algodão tingidas com tingimento sem ensaboamento (A) e com tingimento completo (B), utilizando suor sintético como extrator, em diferentes pH e tempos de extração à 42°C.

Na Tabela 4, a amostra identificada como N.24 foi a que apresentou a maior eficiência de extração por lixiviação do corante Direct Black 38 no suor, obtida nas seguintes condições: fibras de algodão tingidas com adição de álcali, mas sem a etapa de ensaboamento, suor sintético extrator em pH 8,0 à temperatura de extração de 42°C, e durante 8 horas de incubação. A quantidade extraída foi de 5,9 mg/L, o que corresponde à aproximadamente 1% do corante DB38 lixiviado na solução de suor sintético, já que a concentração inicial desse composto no banho de tingimento era de 666,2 mg/L (Figura 20A).

Dessa forma, essa concentração (5,9 mg/L) foi utilizada como referência para avaliar o potencial toxicogenético do corante Direct Black 38 após a sua extração por lixiviação no suor sintético.

4.1.6 Avaliação da genotoxicidade do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético utilizando o teste do cometa com fibroblastos de pele humana.

A Figura 21 mostra o efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com o suor sobre o DNA de fibroblastos de pele humana, assim como a viabilidade celular após 3 horas de exposição. Neste ensaio o controle negativo utilizado foi o branco obtido na lixiviação de fibras controles resultantes do processo de tingimento sem adição do corante, na situação em que houve a maior migração do corante Direct Black 38 para o suor, ou seja, tingimento sem ensaboamento, solução de suor em pH 8,0 à 42°C e com 8 horas de incubação.

Ao controle negativo (solvente) foi adicionado o corante DB38 para se obter a concentração 5,9 mg/L (5,9 µg/mL), ou seja, a maior quantidade de corante que migrou para a solução de suor (pH 8,0) e, a partir dela foram testadas três doses inferiores para o ensaio do cometa (0,0059 µg/mL; 0,059 µg/mL; 0,59 µg/mL; 5,9 µg/mL).

Assim como ocorreu com o corante original, após a lixiviação do DB38 no suor sintético, não detectamos danos ao DNA de fibroblastos de pele humana na concentração lixiviada e nem nas demais doses testadas. A viabilidade celular de todas as doses analisadas foi maior que 80%, como mostra a Figura 21.

FIGURA 21. Efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com suor sintético sobre o DNA, detectado pelo ensaio do cometa e viabilidade celular de fibroblastos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. *** $p < 0,01$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio 70 µM, controle positivo.

4.1.7 Avaliação da genotoxicidade do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético utilizando o teste do cometa com queratinócitos de pele humana.

A Figura 22 mostra o efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com o suor sobre o DNA de queratinócitos humanos, assim como a viabilidade celular após 3 horas de exposição. Como exposto no ensaio acima, o controle negativo utilizado foi a solução de suor em pH 8,0, à 42°C e com 8 horas de

incubação das fibras controles resultantes do processo de tingimento sem corante e sem ensaboamento.

Pode-se observar que após a lixiviação no suor sintético, o corante lixiviado também não induziu a danos ao DNA de HaCaT nas concentrações testadas e a viabilidade celular de todas as doses analisadas foi maior que 80%, como mostra a Figura 22.

FIGURA 22. Efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com o suor sintético sobre o DNA, detectado pelo ensaio do cometa e viabilidade celular de queratinócitos de pele humana após 3 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições. *** $p < 0,01$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. CN: solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio 60 µM, controle positivo.

4.1.8 Avaliação da citotoxicidade do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético utilizando o ensaio com Anexina V e Iodeto de Propídeo com fibroblastos de pele humana.

A Figura 23 mostra o resultado do ensaio de indução de morte em fibroblastos de pele humana provocada pelo corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com suor sintético após 3, 24 e 48 horas de exposição.

Figura 23. Efeito do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com o suor sobre a viabilidade dos fibroblastos de pele humana após 3 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de incubação. CN: solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação; SSP: estaulosporina 15 µM, controle positivo de apoptose; H₂O₂: peróxido de hidrogênio 8,8 mM. Resultado de três repetições realizadas em duplicata. **p<0,05 e ***p<0,01 estatisticamente diferentes dos respectivos controles negativos.

Pode-se observar que após a lixiviação no suor sintético, a quantidade de corante lixiviado não foi capaz de induzir morte em fibroblastos de pele humana. Esse resultado negativo pode ser justificado pela comparação com a dose citotóxica do corante Direct Black 38 original, que é muito superior (≥ 250 µg/mL) à concentração extraída por lixiviação no suor sintético (5,9 µg/mL).

4.1.9 Avaliação da mutagenicidade do corante Direct Black 38 lixiviado no suor sintético utilizando o Ensaio com *Salmonella typhimurium*

Para avaliar a mutagenicidade do corante Direct Black 38 de fibras tingidas extraído por lixiviação com o suor, utilizou-se como controle negativo a solução obtida com o branco obtido na lixiviação de fibras controles no suor em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação das fibras controles resultantes do processo de tingimento sem o corante e sem ensaboamento, porém sem a histidina, utilizada na síntese do suor. Esta modificação foi necessária para evitar resultados falso-positivos, uma vez que as linhagens de *Salmonella* utilizadas neste estudo apresentam mutações nos genes responsáveis pela biossíntese desse aminoácido. Foram testadas as seguintes doses: 0,00059 µg/mL; 0,0059 µg/mL; 0,059 µg/mL; 0,59 µg/mL; 5,9 µg/mL, a partir da maior concentração lixiviada no suor (5,9 µg/mL).

De acordo com a Figura 24, a quantidade de corante lixiviado no suor não foi capaz de induzir mutagenicidade, quando testado com as linhagens TA98 e TA100 na presença e ausência de S9, considerando que o DB38 original apresentou efeito significativamente positivo em doses superiores à concentração extraída por lixiviação com suor sintético, como mostra a Tabela 5

FIGURA 24. Curva dose-resposta para o corante Direct Black 38 extraído por lixiviação com suor, testado com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na presença e ausência de ativação metabólica exógena (S9).

TABELA 5. Número de revertentes induzidos pelo corante Direct Black 38 original e extraído por lixiviação com suor, utilizando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na presença de ativação metabólica exógena (S9).

Direct Black 38 ($\mu\text{g/mL}$)	Número de Revertentes	
	TA98 (média $\pm$ DP) + S9	TA100 (média $\pm$ DP) + S9
Original		
CN	34,7 $\pm$ 5,5	225,0 $\pm$ 11,3
5	36,3 $\pm$ 1,5	233,0 $\pm$ 19,5
50	39,7 $\pm$ 4,5	241,7 $\pm$ 13,0
100	79,0 $\pm$ 1,4**	243,0 $\pm$ 11,3
250	101,5 $\pm$ 0,7**	269,5 $\pm$ 24,7
500	152,3 $\pm$ 11,1**	280,3 $\pm$ 27,7
5000	32,67 $\pm$ 9,5	297,0 $\pm$ 1,4**
Extraído		
CN	36,8 $\pm$ 3,6	188,6 $\pm$ 15,8
0,00059	34,7 $\pm$ 3,5	194,0 $\pm$ 22,3
0,00590	34,7 $\pm$ 1,5	188,7 $\pm$ 24,9
0,05900	32,7 $\pm$ 5,0	187,0 $\pm$ 20,9
0,59000	32,0 $\pm$ 5,0	183,0 $\pm$ 13,4
5,90000	32,0 $\pm$ 6,0	212,0 $\pm$ 14,7

** $p < 0,05$ estatisticamente diferente em relação aos respectivos controles negativos (CN: DMSO, para o original e solução obtida com o branco extraído por lixiviação em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação, para o extraído).

4.2 Efeitos ecotoxicológicos dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15

4.2.1 Avaliação da fitotoxicidade dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais utilizando o teste de germinação de sementes e crescimento de raízes de pepino, alface e tomate.

Os efeitos dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre a porcentagem de germinação das sementes e o comprimento das raízes de cada semente germinada de tomate, pepino e alface são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6. Taxa de germinação das sementes e comprimento das raízes de pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*) após 120 horas de incubação na ausência de luz, à 20°C ± 1°C com os corantes Direct Black 38 (DB38) e Reactive Blue 15 (RB15). Os resultados estão apresentados como média de três repetições ± DP (desvio-padrão).

Concentrações (mg/L)	Taxa de germinação e comprimento das raízes (média ± DP)					
	<i>Cucumis sativus</i>		<i>Lactuca sativa</i>		<i>Lycopersicon esculentum</i>	
	Semente (%)	Raiz (cm)	Semente (%)	Raiz (cm)	Semente (%)	Raiz (cm)
DB 38						
0,0	100,0 ± 5,8	3,58 ± 1,90	100,0 ± 5,8	3,37 ± 1,49	100,0 ± 15,3	3,48 ± 1,04
62,5	111,5 ± 5,8	3,39 ± 1,57	96,6 ± 11,5	3,10 ± 1,03	92,3 ± 0,0	4,05 ± 1,12
125	111,5 ± 5,8	3,50 ± 1,27	93,1 ± 10,0	3,26 ± 1,38	88,5 ± 11,5	4,24 ± 0,84
250	103,8 ± 10,0	3,67 ± 1,20	100,0 ± 5,8	3,43 ± 1,40	92,3 ± 10,0	3,94 ± 1,23
500	10,7 ± 5,8	3,45 ± 1,22	103,4 ± 0,0	2,96 ± 0,96	84,6 ± 5,8	3,75 ± 1,54
1000	107,7 ± 5,8	3,17 ± 1,35	100,0 ± 5,8	2,87 ± 0,86	88,5 ± 5,8	3,50 ± 0,97
RB 15						
0,0	100,0 ± 5,8	3,37 ± 1,49	100,0 ± 5,80	4,46 ± 0,86	100 ± 11,5	3,25 ± 1,02
62,5	96,2 ± 5,8	3,10 ± 1,03	100,0 ± 5,80	4,82 ± 0,64	92 ± 15,3	3,70 ± 1,02
125	100,0 ± 5,8	3,26 ± 1,38	100,0 ± 5,80	5,10 ± 0,97	104 ± 11,5	3,81 ± 1,04
250	103,8 ± 10,0	3,43 ± 1,40	100,0 ± 5,80	5,31 ± 0,83	92 ± 5,8	3,83 ± 0,80
500	107,7 ± 11,5	2,96 ± 0,96	100,0 ± 5,80	5,14 ± 1,30	88 ± 5,8	3,89 ± 1,08
1000	111,5 ± 5,8	2,87 ± 0,86	96,6 ± 5,80	4,63 ± 0,96	92 ± 11,5	4,39 ± 1,07

De acordo com a Tabela 6 não houve diferenças estatísticas significativas entre as concentrações analisadas dos corantes e os respectivos controles negativos nos dois parâmetros avaliados.

Assim, podemos concluir que os corantes DB38 e RB15 não são fitotóxicos para as sementes de tomate, pepino e alface, considerando os parâmetros porcentagem de germinação das sementes e comprimento das raízes, nas condições testadas.

4.2.2 Avaliação da toxicidade aguda dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre minhocas *Eisenia foetida*

Os efeitos dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre a mortalidade das minhocas *E. foetida* são mostrados na Tabela 7. As minhocas foram classificadas como mortas quando não respondiam aos estímulos mecânicos executados gentilmente, ou seja, após estimuladas, não se moviam através dos tubos.

TABELA 7. Número de minhocas vivas por concentração testada no início (N_0) e no final do teste (N_{48}), após 48 horas de exposição com os corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15.

Concentração (mg/L)	N_0	N_{48}
Direct Black 38		
CN	10/10	10/10
0,1	10/10	10/10
1,0	10/10	10/10
10	10/10	10/10
100	10/10	10/10
1000	10/10	10/10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10/10	02/10
Reactive Blue 15		
CN	10/10	10/10
0,1	10/10	10/10
1,0	10/10	10/10
10	10/10	10/10
100	10/10	10/10
1000	10/10	10/10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10/10	01/10
CN: água destilada - controle negativo		
ZnSO ₄ .7H ₂ O: sulfato de zinco (6 mg/L) - controle positivo		

Os corantes avaliados não apresentaram valores de DL_{50} , já que as concentrações testadas de DB38 e RB15 não induziram toxicidade em minhocas adultas *E. foetida*, após 48 horas de exposição, como mostra a Tabela 7.

4.2.3 Avaliação da toxicidade aguda dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre *Daphnia magna*.

O efeito observado no teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foi a imobilidade dos organismos. A Figura 25 apresenta esses resultados, assim como os valores de CE_{50} , gerados pelo programa Probit, que determinam a concentração estimada dos corantes para imobilizar 50% dos neonatos após 48 horas de exposição.

FIGURA 25. Efeito dos corantes Direct Black 38 (A) e Reactive Blue 15 (B) sobre a imobilidade de *Daphnia magna* após 48 horas de exposição. *CE₅₀ = 1698,2 mg/L e **CE₅₀ = 686,5 mg/L.

Observa-se que o corante Direct Black 38 tem pouco efeito sobre os neonatos *D. magna*, apresentando um valor CE₅₀ muito alto (1698,2 mg/L). Enquanto que o corante Reactive Blue 15 foi capaz de imobilizar 50% dos neonatos na concentração de 750 mg/L, obtendo a CE₅₀ em 686,5 mg/L.

4.2.4 Determinação de malformações induzidas pelos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*)

Os efeitos dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 originais sobre os embriões e as larvas de zebrafish (*Danio rerio*) são mostrados na Figura 26. Os corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 não induziram mortalidade após 24 e 48 horas de exposição (dados não mostrados), porém provocaram falhas na inflação da bexiga natatória. Este efeito pode ser observado na Figura 26A, que mostra que a partir da concentração 6,25 µg/mL e após 96 horas de exposição, o corante DB38 já inibiu significativamente a formação ou impediu a inflação da bexiga natatória das larvas de zebrafish. Essa malformação continuou a se manifestar após 120 e 144 horas de exposição. O mesmo fato ocorreu com o corante RB15, porém a partir de uma concentração maior (50 µg/mL) e após 144 horas de exposição (Figura 26C e 27B). O corante DB38 também induziu significativamente danos na cauda das larvas de zebrafish, na maior concentração testada (25 µg/mL) após 120 e 144 horas

(Figura 26B e 27D). Este dano não foi significativo para o corante RB15 quando comparado ao controle negativo e nas condições testadas (Figura 26D).

FIGURA 26. Efeito dos corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 sobre a bexiga natatória (A,C) e a cauda (B,D) de larvas de zebrafish (*Danio rerio*), após 96, 120 e 144 horas de exposição. CN: água de diluição - controle negativo.

FIGURA 27. Fotomicroscopia obtida neste trabalho, mostrando o efeito do corante Reactive Blue 15 sobre a bexiga natatória de larvas de zebrafish (B) após 144 horas de exposição. Efeito do corante Direct Black 38 sobre a cauda de larvas de zebrafish após 48 horas de exposição (D) Controle negativo: água de diluição (A,C). Visualização em aumentos de 2x e 3x, respectivamente.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do corante Direct Black 38 extraído por lixiviação das fibras têxteis com suor.

Como já mencionado, cerca de 800.000 toneladas de corantes são produzidas, anualmente, no mundo todo (SPADARO, GOLD, RENGANATHAN, 1992; RAJAGURU *et al.*, 1999; ROBINSON *et al.* 2001; MANSOUR *et al.* 2007) e os que contêm a função azo-aromático como cromóforo, constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzido, representando 60 a 70% desse total (GUARATINI, ZANONI, 2000; KONSTANTINO, ALBANIS, 2004; MANSOUR *et al.* 2007).

O corante Direct Black 38 é um triazo, à base de benzidina, uma amina aromática, classificada como carcinógeno humano pela International Agency for Research on Cancer (IARC) (MANTHUR *et al.*, 2005). Na ausência de dados específicos, todos os corantes à base de benzidina são classificados como “compostos carcinogênicos”. Assim, a presença de benzidina na molécula do corante representa um alerta ao potencial de carcinogenicidade do composto (BAYRAMOGLU, ARICA, 2007).

Embora a Comunidade Européia tenha banido o uso de corantes a base de benzidina desde 2003 (DIRECTIVE 2002/61/EC), a literatura tem mostrado que países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não têm cessado completamente a produção de alguns corantes à base de benzidina, devido à grande potencialidade econômica desses compostos (GUARATINI, ZANONI, 2000; MANTHUR *et al.*, 2005; SAUER *et al.*, 2006; BANDALA *et al.*, 2008; DAPSON, 2009).

Considerando os resultados obtidos com esse trabalho, o corante Direct Black 38 não causou genotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos de pele humana na forma original (Figuras 12 e 13), porém, por se tratar de um composto que origina benzidina após a clivagem das ligações azo, este composto apresentou atividade mutagênica positiva, quando testado pelo ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*/microssoma, na presença de sistema de metabolização exógeno (mistura S9). A Figura 15 indica que o corante Direct Black 38 original induz mutações gênicas principalmente por deslocamento do quadro de leitura do DNA (potência mutagênica de 2,5 revertente/ μ g) e substituição de pares de base (0,1 revertente/ μ g), detectadas pelas linhagens TA98 e TA100, respectivamente, na

presença de S9. Esse corante também provocou a morte de fibroblastos de pele humana por necrose após 48 horas de exposição (Figura 14).

Os riscos toxicológicos à saúde humana estão intrinsecamente relacionados ao modo e tempo de exposição. Assim, a proximidade entre o tecido tingido e zonas da pele sujeitas à transpiração poderia gerar metabólitos ativos dos azo corantes por atividades bacterianas na pele humana. Nosso grupo tem mostrado que muitos azo corantes são mutagênicos ou citotóxicos (CHEQUER *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2010, OLIVEIRA *et al.*, 2010), porém nenhum estudo na literatura mostra os possíveis efeitos da exposição a estes compostos por meio do contato de tecidos tingidos com a pele.

Neste contexto, a exposição cutânea humana deve ser considerada uma importante rota de exposição a corantes têxteis, devido a possível migração desses compostos presentes em tecidos tingidos, sob certas condições, tais como a sudorese. Além disso, a avaliação do risco de corantes têxteis através da pele deve considerar alguns aspectos importantes, como: a eficácia do processo de tingimento no fornecimento de solidez da cor nos tecidos e as características do suor em situações distintas (por exemplo, a termorregulação do corpo).

Meinke *et al.* (2009) realizaram um estudo de avaliação de risco com um corante têxtil fluorescente e não tóxico, utilizando métodos *in vivo* e *in vitro*. Os autores fizeram o tingimento das fibras têxteis sem ensaboamento para favorecer tanto a adsorção do corante na pele dos voluntários como a extração do mesmo nas soluções de suor sintético. Eles concluíram que houve a migração do corante para a solução de suor e que situações de transpiração excessiva proporcionam uma maior taxa de migração e subsequente penetração do corante na pele.

Como dito anteriormente, a sudorese é um mecanismo essencial para a termorregulação. A concentração de eletrólitos no suor é uma característica individual e está intimamente relacionada com o pH do suor (COYLE *et al.*, 2009). O suor é ácido e seu pH varia entre 4,0 e 6,8 (LOUREIRO, 2007). Doran *et al.* (1993) avaliaram o pH de transpiração de homens e mulheres submetidos a exercícios físicos leves em academias e observaram a produção de suor ácido variando entre 6,1 e 6,7. Assim, os autores concluíram que o pH de transpiração parece ser independente do sexo do atleta. Porém, a presença de doenças e administração de medicamentos pode afetar drasticamente esta faixa normal de pH (DORAN *et al.*, 1993).

A taxa de sudação aumenta de acordo com o aumento da temperatura corporal. Em pessoas normais, a sudorese térmica ocorre em repouso apenas em temperaturas externas superiores à 24°C. Mas, o suor não é uma resposta exclusiva à um estímulo térmico. Ele pode ocorrer em situações de ansiedade e estresse. O suor emerge na pele de forma pulsátil, aparecendo sincronicamente em diferentes partes da superfície corpórea. As glândulas sudoríparas são comumente encontradas nas palmas das mãos, nas solas dos pés, nas faces e nas axilas. Nestas regiões as glândulas estão sob influência não somente do calor, mas também de fatores psicológicos. Nas demais partes do corpo, como nas costas e no abdômen, elas são influenciadas quase exclusivamente pela temperatura (LOUREIRO, 2007).

O suor é uma mistura isotônica de água, sódio, potássio, uréia, aminoácidos, enzimas, lactato, cloreto, bicarbonato e compostos orgânicos (LOUREIRO, 2007; COYLE *et al.*, 2009). De acordo com a literatura, a composição do suor varia não somente entre os indivíduos, mas também com o tempo de exercício físico e o estado de aclimatização (COYLE *et al.*, 2009).

Portanto, com o intuito de mimetizar o suor humano e fornecer dados sobre a migração de corantes têxteis das roupas tingidas para o corpo, assim como avaliar os efeitos tóxicos do produto de lixiviação no suor, neste trabalho foram sintetizadas diferentes soluções de suor artificial, com pH de 5,5; 6,5 e 8,0 e foram realizados dois tipos de tingimento das fibras de algodão, o tingimento com adição de álcali e sem ensaboamento e o tingimento completo (com adição de álcali e ensaboamento).

As etapas de lavagem e ensaboamento do processo de tingimento têxtil são necessárias para eliminar o corante hidrolisado e, conseqüentemente, obter o grau máximo de solidez aos tratamentos úmidos. O ensaboamento é realizado posteriormente às lavagens pela aplicação de um dispersante/sequestrante, que impede que o corante retorne para a fibra. O efeito sequestrante mantém o corante hidrolisado solubilizado, impedindo sua precipitação e fazendo com que esse processo tenha maior eficiência na manutenção da solidez em relação à luz, lavagem e transpiração (PICOLLI, 2008).

Apesar do ensaboamento consistir no tratamento final dos processos de tingimento das indústrias têxteis, sabe-se que alguns tecidos quando umedecidos pelo suor durante o uso da roupa, ou durante a lavagem, são capazes de se desprenderem das fibras têxteis, situações que são confirmadas pelo desbotamento

do tecido ou pelo ato de manchar outras roupas no mesmo banho (ALCÂNTARA, DALTIM, 1996).

Assim, neste trabalho o tingimento sem ensaboamento foi executado com a finalidade de compará-lo com o tingimento completo, mas principalmente para simular um cenário de maior gravidade com relação ao desprendimento do corante das fibras quando colocadas em contato com o suor. Esse procedimento também foi realizado por Meinke *et al.* (2009) com o mesmo intuito.

Baseado no monitoramento do corante por análises em HPLC-DAD, determinou-se que a maior taxa de migração (~1%) do Direct Black 38 para a solução de suor sintético ocorreu na maior temperatura testada (42°C), em pH 8,0 e após 8 horas de exposição das fibras tingidas sem ensaboamento (Figuras 17A e 20A, Tabela 4). Dessa forma, fica evidente que o suor é capaz de extrair corantes de tecidos em altas temperaturas, o que colocaria em risco principalmente atletas e trabalhadores que estão expostos à ambientes, onde a transpiração é um mecanismo natural.

Considerando esses resultados, o corante Direct Black 38 extraído por lixiviação no suor sintético não causou genotoxicidade em fibroblastos e queratinócitos de pele humana (Figuras 21 e 22) e não foi capaz de induzir mutagenicidade, quando testado com as linhagens TA98 e TA100 na presença e ausência de S9 (Figura 24). Esse fato pode ser justificado através da comparação com os resultados do corante DB38 original, que apresentou efeito significativamente positivo em doses maiores do que a concentração lixiviada no suor sintético (Tabela 5). A citotoxicidade do corante original também não foi mais observada, considerando que, apenas ~1% do corante Direct Black 38 foi lixiviado no suor sintético e que o efeito citotóxico aconteceu nas maiores concentrações testadas do corante original (Figura 14).

Embora os resultados sejam negativos para o corante Direct Black 38, é imprescindível realizar a avaliação toxicológica não só dos corantes têxteis individualmente, mas também dos tecidos que os contêm, assim como desenvolver técnicas de tingimento que proporcionem maior resistência às condições úmidas.

5.2 Ecotoxicidade dos corantes originais Direct Black 38 e Reactive Blue 15

Como citado anteriormente, durante o processamento têxtil, a ineficiência no tingimento, mais precisamente na etapa de fixação do corante à fibra, resulta em grandes quantidades de resíduos sendo diretamente perdidos para os efluentes, e que consequentemente são lançados no ambiente aquático. A quantidade de corante perdido é dependente da classe de corante utilizado na aplicação das fibras, variando de 2% de perda quando se utiliza corantes básicos a 50% perdidos para corantes reativos (RAJAGURU *et al.*, 1999; McMULLAN *et al.*, 2001; KONSTANTINO, ALBANIS, 2004; GURAV *et al.*, 2011; MANSOUR *et al.*, 2012). Dentro deste contexto, o estudo dos efeitos deletérios destes compostos é importante não somente para a saúde humana, mas também para o ecossistema.

O uso de bioensaios para a avaliação da toxicidade de compostos sobre o o ambiente recebeu maior atenção nos últimos vinte anos. Os bioensaios são ferramentas desejáveis para análise da qualidade dos ecossistemas, uma vez que somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas, tais como demanda química de oxigênio, demanda bioquímica de oxigênio, sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias de caráter orgânico ou inorgânico, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente e, por isso, não são suficientes para avaliar o potencial impacto ambiental dos contaminantes (BANKS, SCHULTZ, 2005; COSTA *et al.*, 2008). Além disso, esses testes podem ser úteis para prever a biodisponibilidade dos agentes tóxicos, uma vez que os efeitos podem ocorrer em níveis inferiores aqueles detectáveis pelos ensaios químicos (BANKS, SCHULTZ, 2005).

Segundo Kapanen e Itavaara (2001), os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crônico), o tipo de efeito (morte, crescimento ou reprodução) ou a resposta do efeito (letal ou sub-letal).

O indicador de letalidade mais comumente utilizado é o DL₅₀, correspondente à dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste. Essa resposta é considerada mais significativa para ser extrapolada a uma população. Os efeitos que continuam por longo tempo se traduzem como efeitos crônicos ou sub-letais e podem abranger parte ou todo o ciclo de vida dos organismos (COSTA *et al.*, 2008; PALÁCIO *et al.*, 2012).

Plantas sensíveis às substâncias tóxicas podem ser utilizadas como indicadores da qualidade do ambiente, constituindo-se bioensaios de fitotoxicidade (PALÁCIO *et al.*, 2012). De acordo com a Tabela 6, os corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15, em todas as concentrações testadas, não foram capazes de inibir o processo germinativo (efeitos letais) e nem o desenvolvimento das raízes e radículas (efeitos sub-letais) de pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*), o que indica que esses compostos não são fitotóxicos para essas espécies vegetais.

Entretanto, Byberg *et al.* (2013) avaliaram a mineralização e a toxicidade de 6 azo corantes diretos (Direct Red 80, Direct Red 81, Direct Red 23, Direct Violet 51, Direct Yellow 27, and Direct Yellow 50) sobre as sementes de alface (*L. sativa* L.), antes e após a degradação fotocatalítica e, observaram que os efeitos tóxicos são parcialmente reduzidos, já que alguns sub-produtos gerados pelo tratamento podem ser mais tóxico que o corante original. Sendo assim, os bioensaios realizados conjuntamente às análises físico-químicas fornecem informações importantes para o monitoramento da qualidade do efluente que contém esses compostos, com o intuito de reduzir o impacto ambiental (PALÁCIO *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, as minhocas (Anellida, Oligochaeta) têm sido amplamente utilizadas como organismos-teste para avaliar o potencial tóxico de contaminantes no solo, uma vez que esses invertebrados estão em contato constante e direto com as partículas das superfícies interna e externa. As espécies *Eisenia foetida* e *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) são mais comumente usadas, sendo o bioensaio de mortalidade uma importante ferramenta para estudos ecotoxicológicos. Neste trabalho, não foi observado nenhum efeito significativo sobre a sobrevivência das minhocas da espécie *Eisenia foetida* expostas aos corantes (Tabela 7), o que significa que esses compostos não induzem efeitos letais sobre esses invertebrados terrestres nas condições testadas.

Testes de toxicidade com invertebrados aquáticos também fornecem importante suporte na determinação de impactos químicos ao ambiente. O microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* tem sido amplamente utilizado como indicador biológico em estudos e controle da qualidade da água e em testes de toxicidade na avaliação de efluentes (LAITANO, MATIAS, 2006). No presente estudo, também foi investigado o efeito agudo dos corantes têxteis sobre este organismo-teste.

Ambos os corantes estudados exibiram baixa toxicidade à *D. magna*, sendo classificados como relativamente não tóxicos ($CE_{50} > 100$ mg/L) de acordo com Bae e Freeman (2007) e Verma (2008). Mesmo que o efeito observado seja de baixa intensidade, é possível verificar que o corante RB15 possui potência ($CE_{50} = 686,5$ mg/L) cerca de 2,5 vezes maior que a do corante DB38 ($CE_{50} = 1698,2$ mg/L) (Figura 26). Essa diferença na toxicidade pode ser explicada pela estrutura química do corante Reactive Blue 15 que apresenta um átomo de cobre em sua constituição (Figura 4B). Bae e Freeman (2007) demonstraram que corantes diretos complexados ao átomo de cobre, são altamente tóxicos para *D. magna* e que esse metal desempenha uma importante função na toxicidade aquática de corantes.

É importante que o efeito tóxico de uma substância química seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, de preferência pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, devido às diferenças de sensibilidade apresentadas por organismos de diferentes espécies. A utilização de uma bateria de testes com pelo menos quatro organismos de diferentes níveis de organização biológica é apropriada para avaliar a ecotoxicidade de um composto químico ou efluente (COSTA *et al.*, 2008).

Assim, no presente trabalho, embora os ensaios com sementes e minhocas tenham apresentado resultados negativos e o teste com *D. magna* tenha sido fracamente positivo, escolhemos ainda um organismo superior para complementar a avaliação.

Nas últimas décadas, ensaios utilizando embriões e larvas do peixe zebrafish (*Danio rerio*) têm atraído à atenção de toxicologistas como organismos modelo para estudos da toxicidade de compostos químicos em relação ao desenvolvimento desse vertebrado tanto para a avaliação do risco ambiental quanto humano (SCHOLZ *et al.*, 2008; CARLSSON *et al.*, 2013).

Um dos motivos responsáveis pelo destaque do zebrafish como modelo para pesquisas biomédicas, ambientais, toxicológicas e ecotoxicológicas é que a atual legislação Européia (DIRECTIVE 2010/63/EU) sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos considera que os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish não precisam de regulamentação, uma vez que embriões e larvas não alcançaram a alimentação exógena e, por isso não são considerados animais (DIRECTIVE 2010/63/EU; SCHOLZ *et al.*, 2008; TEIXIDÓ *et al.*, 2013). Assim, por razões éticas os testes com embriões de zebrafish têm sido propostos como uma

alternativa para a substituição dos experimentos com animais adultos (SCHOLZ *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2010; TEIXIDÓ *et al.*, 2013).

Como indicado nas Figuras 26A e 26C, os corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 induzem falhas na inflação da bexiga natatória de larvas de zebrafish, comprometendo a sua motilidade, o que levará à morte do organismo. O corante Direct Black 38 ainda induziu outra malformação, relacionada a deformação da cauda das larvas do zebrafish (Figura 26B). Essa é a primeira vez que os efeitos tóxicos de corantes têxteis sobre o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish (*D. rerio*) são relatados (Figura 27).

Com base em nossos resultados obtidos no ensaio de malformações em embriões e larvas de zebrafish, fica evidente a necessidade e importância de se estudar outros efeitos que não a toxicidade aguda (letalidade) na avaliação do impacto da presença de corantes no ecossistema aquático.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- O corante original Direct Black 38 não é genotóxico para fibroblastos e queratinócitos de pele humana nas condições testadas;
- O corante original Direct Black 38 é citotóxico para fibroblastos de pele humana, provocando morte celular por necrose após 48 horas de exposição;
- O corante original Direct Black 38 é mutagênico para as linhagens TA98 e TA100, na presença de ativação metabólica exógena (S9), e, portanto, causa mutação pontual tanto por deslocamento do quadro de leitura do DNA quanto por substituição dos pares de bases, após metabolização pelo citocromo P-450;
- Houve a extração por lixiviação do corante Direct Black 38 com suor sintético e a maior taxa dessa migração ocorreu em pH 8,0 à 42°C e após 8 horas de exposição das fibras de algodão tingidas sem ensaboamento;
- O corante Direct Black 38 extraído por lixiação com suor não é genotóxico para fibroblastos e queratinócitos de pele humana nas condições testadas;
- O corante Direct Black 38 extraído por lixiação com suor não é citotóxico para fibroblastos de pele humana, uma vez que a concentração do DB38 lixiviado é muito menor em relação às doses do corante original que causaram o efeito citotóxico;
- A solução de suor obtida após a lixiviação do corante Direct Black 38 não apresentou atividade mutagênica para as linhagens TA98 e TA100, na presença ou ausência de ativação metabólica exógena (S9), já que a concentração do DB38 lixiviado é muito menor em relação às doses do corante original que causaram o efeito mutagênico;
- Embora a solução de suor contendo o corante Direct Black 38 tenha originado respostas negativas, o uso deste composto em roupas deve ser evitado, considerando a resposta positiva obtida no ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* para o corante original, na presença de S9. O contato dérmico com roupas tingidas pode favorecer a ação de bactérias metabolizadoras e de

enzimas de biotransformação presentes na pele, gerando produtos mutagênicos.

- Os corantes originais Direct Black 38 e Reactive Blue 15 não são fitotóxicos para espécies de pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*);
- Os corantes originais Direct Black 38 e Reactive Blue 15 não são tóxicos para minhocas da espécie *Eisenia foetida*;
- Ambos os corantes Direct Black 38 e Reactive Blue 15 são fracamente tóxicos para *Daphnia magna*. Porém, o RB15 apresenta maior potencial tóxico em relação ao DB38;
- Os corantes originais Direct Black 38 e Reactive Blue 15 induzem à malformações em embriões e larvas de zebrafish *Danio rerio*, caracterizadas por falha na inflação da bexiga natatória e alteração da cauda;
- Nossos resultados claramente apontam para a necessidade de realização de testes com organismos aquáticos que revelam outros efeitos além da toxicidade aguda, como as malformações.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÂLCANTARA, M.R.; DALTIM, D. A Química do Processamento Têxtil. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n.3, p. 320-330, 1996.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v.62, n.3, p.286-290, 2005.

ARSLAN, I.; BALCIOGLU, I.A.; BAHNEMAN, D.W. Heterogeneous photocatalytic treatment of simulated dyehouse effluents using novel TiO₂-photocatalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.26, p.193-206, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUM), Brasília.
História. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp>
Acesso em: 28 de Setembro de 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). **A industrialização no Brasil e o desenvolvimento da moda: um ensaio**. Disponível em: <<http://www.abit.org.br/content/area/Pasta.asp?nCodAreaConteudo=23&nCodPastaPai=705>> Acesso em: 28 de Setembro de 2012.

BAE, J.S.; FREEMAN, H.S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes Pigment**, v. 73, n.1, p.81–85, 2007.

BANDALA, E.R.; PELAEZ, M.A.; GARCÍA-LOPEZ, J.; SALGADO, M.J.; MOELLER, G. Photocatalytic decolourisation of synthetic and real textile wastewater containing benzidine-based azo dyes. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p.169–176, 2008.

BANKS, M.K.; SCHULTZ, K.E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.167, p.211-219, 2005.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**, v.97, p.267-281, 1982.

BRITO-PELEGRINI, N.N., PATERNIANI, J.E.S., BROTA, G.A., SANTOS, E. M., SILVA, N.B., PELEGRINI, R.T. Ensaio biológicos com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratados por processo fotoquímico. **Minerva**, v.6, n.3, p.219-228, 2009.

BROOKSTEIN, D.S. Factors Associated with Textile Pattern Dermatitis Caused by Contact Allergy to Dyes, Finishes, Foams, and Preservatives. **Dermatologic Clinics**, v.27, p.309–322, 2009.

BS EN 1811: The Reference Test Method for Nickel Release, 1999.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, p.878 – 882, 2004.

BYBERG, R.; COBB, J.; MARTIN, L.D.; THOMPSON, R.W.; CAMESANO, T.A.; ZAHRAA, O.; PONS, M.N. Comparison of photocatalytic degradation of dyes in relation to their structure. **Environmental Science and Pollution Research International**, 2013. DOI 10.1007/s11356-013-1551-y.

CARLSSON, G.; PATRING, J.; KREUGER, J.; NORRGREN, L.; OSKARSSON, A. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v.15, p.126:30-41, 2013.

CARNEIRO, P.A.; OSUGI, M.E.; SENE, J.J.; ANDERSON, M.A.; ZANONI, M.V.B. Evaluation of color removal and degradation of a reactive textile azo dye on nanoporous TiO thin-film electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 49, p.3807–3820, 2004.

CHEQUER, F.M.D.; ANGELI, J.P.F.; FERRAZ, E.R.A.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA, D.P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research**. v.676, p.83–86, 2009.

CHUNG, K.T.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutation Research**, v.277, p. 201-220, 1992.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E. The reduction of azo dyes by intestinal microflora. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.12, p. 2121-2132, 1993.

CLAXTON, L.D.; ALLEN, J.; AULETTA, A.; MORTELMANS, K.; NESTMANN, E.; ZEIGER, E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/ mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v.189, p.83 -91, 1987.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues, **Mutagenesis**, v.23, p.143–151, 2008.

COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO [SABESP]. Disponível em: <http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=2&temp2=3&proj=sabesp&pub=T&nome=Uso_Racional_Agua_Generico&db=&docid=0559F0B0B4127513832570D1006527A2> Acesso em: 12/04/2013.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL [CETESB]. Setor de Mutagênese e Citotoxicidade – DAMM. Divisão de Análises Microbiológicas Ambientais – DAM. **Bioensaios de mutagenicidade para avaliação de amostras ambientais – Teste de Ames**. São Paulo, 1997.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação, **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

COYLE, S.; MORRIS, D.; LAU, K.; DIAMOND, D.; TACCINI, N.; CONSTANZO, D.; ALVO, P.; DI FRANCESCO, F.; TRIVELLA, M. G. ; PORCHET, J. A.; LUPRANO, J. Textile sensors to measure sweat pH and sweat-rate during exercise. In: **Pervasive Health** ISBN 978-963-9799-42-4, 2009.

DAPSON, R.W. Benzidine-based dyes: effects of industrial practices, regulations, and world trade on the biological stains market. **Biotechnic & Histochemistry**, v.84, n.3, p. 95-100, 2009.

DIRECTIVE 2002/61/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azocolourants). Official Journal of the European Union, L 243/15, July 19, 2002.

DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union, L276:33–79, September 22, 2010.

DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C.K.; MENDO, S.; SOARES, A.M. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.152, n.3, p.338-45, 2010.

DORAN, D.; TIERNEY, J.; VARANO, M.; WARE, S. A Study of the pH of Perspiration from Male and Female Subjects Exercising in the Gymnasium. **Journal of Chemical Education**, v.70, n.5, p.412-414, 1993.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Research**, v. 57, p.1835–1840, 1997.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicology Patology**, v.35, p.495-516, 2007.

FERRAZ, E.R.A. **Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatalise e cloração convencional na remoção dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas**: Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Toxicologia, Ribeirão Preto, 2011.

FERRAZ, E.R.A.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F.M.D.; ZANONI, M.V.B.; DORTA, D.J.; OLIVEIRA, D.P. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and Daphnia acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v.26, p.489-497, 2011.

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS (FINEP), Rio de Janeiro. **Relatório Setorial Preliminar**. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/PortalDPP/relatorio_setorial/impressao_relatorio.asp?lst_setor=23> Acesso em: 28 de Janeiro de 2010.

FRANCE, B.F.; CARTER, M.H.; JOSEPHY, P.D. Comparative metabolism and mutagenicity of azo and hydrazone dyes in the Ames test. **Food and Chemical Toxicology** v. 24, p. 165-169, 1986.

FRANCISCON, E.; GROSSMAN, M.J.; PASCHOAL, J.A.; REYES, F.G.; DURRANT, L.R. Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated *Brevibacterium* sp. strain VN-15. **SpringerPlus**, v.1, n.37, p.1-10, 2012.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z.W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology letters**, v.151, p.203-210, 2004.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canos: Ulbra, 2003. p.173-200.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. A Estrutura de Genes e Genomas. In: **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a. Cap 2, p.23-48.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Mutações Gênicas. In: **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001b. Cap 7, p.177-204.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Mutação Gênica. In: **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998a. cap 7, p.169-194.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Mecanismos de Alteração Genética I: Mutação Gênica. In: **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998b. Cap 19, p.554-583.

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

GUENDOUZ, S.; KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M.; OUCHEFOUN, M. Biosorption of synthetic dyes (Direct Red 89 and Reactive Green 12) as an ecological refining step in textile effluent treatment. **Environmental Science and Pollution Research**, DOI 10.1007/s11356-012-1314-1, 2012.

GURAV, A.A.; GHOSH, J.S.; KULKARNI, G.S. Decolorization of anthroquinone based dye Vat Red 10 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, v.2, n.6, p.93-97, 2011.

GUTIERREZ, M. F.; PAGGI, J. C.; GAGNETEN, A. M. Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. **Ecotoxicology**, v.21, p.428-438, 2012.

HASSAN, S.A.; MOUSSA, E.A.; ABBOTT, L.C. The effect of methylmercury exposure on early central nervous system development in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Journal of Applied Toxicology**, v.32, n.9, p.707-13, 2012.

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

HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSENA, J.; GIESSEN, W.J.V.D. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v.7, p.165-172, 2006.

ISO 105-E04: Textiles – Tests for Colour Fastness. Part: E04: Colour Fastness to Perspiration. Beuth Verlag, Berlin, 1994.

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

JARVIS, A.S.; HOKEYCETT, M.E.; McFARLAND, V.A.; BULICH, A.A.; BOUNDS, H.C. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v.33, p.193-200, 1996.

KAHRU, A.; PÕLLUMAA, L. Environmental hazard of the waste streams of the Estonian oil-shale industry: an ecotoxicological review. **Oil Shale**, v.23, n.1, p. 53-93, 2006.

KATRITZKY, A.R.; DOBCHEV, D.A.; FARA, D.C.; HÜR, E.; TÄMM, K.; KURUNCZI, L.; KARELSON, M.; VARNEK, A.; SOLOV'EV, V.P. Skin Permeation Rate as a Function of Chemical Structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.3305–3314, 2006.

KLOBUČAR, G.I.; STAMBUK, A.; SRUT, M.; HUSNJAK, I.; MERKAŠ, M.; TRAVEN, L.; CVETKOVIĆ, Z. *Aporrectodea caliginosa*, a suitable earthworm species for field based genotoxicity assessment? **Environmental Pollution**, v.159, n.4, p.841-849, 2011.

KONSTANTINO, I.K.; ALBANIS, T.A. TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations - A review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 49, p.1–14, 2004.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L.M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.110, n.1-2, p.13-24, 1999.

KULTHONG, K.; SRISUNG, S.; BOONPAVANITCHAKUL, K.; KANGWANSUPAMONKON, W.; MANIRATANACHOTE, R. Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. **Particle and Fibre Toxicology**, v.7, n.8, p.1-9, 2010.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p.78-82, 2002.

LADEMANN, J., PATZELT, A., WORM, M., RICHTER, H., STERRY, W., MEINKE, M. Analysis of *in vivo* penetration of textile dyes causing allergic reactions. **Laser Physics Letters**, v.6, p.759–763, 2009.

LAITANO, K.S.; MATIAS, W.G. Testes de Toxicidade com *Daphnia magna*: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.1, n.1, p.43-47, 2006.

LANGDON, C.J.; PEARCE, T.G.; MEHARGD, A.A.; SEMPLE, K.T. Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. **Environmental Pollution**, v.124, p.361–373, 2003.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v.269, p.1–20, 2007.

LEWIS, R. Estrutura e replicação do DNA in: _ **Genética Humana – Conceitos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 9, p.167-184.

LORD, C.J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v.481, p.287–294, 2012.

LOUREIRO, M.P. **Simpatectomia lombar endoscópica retroperitoneal em mulheres: efeito sobre o suor compensatório**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação Cirurgia Torácica e Cardiovascular da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LOWE, S.W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, London, v.21, p.485-495, 2000.

MANSOUR, H.B.; CORROLER, D.; BARILLIER, D.; GHEDIRA, K.; CHEKIR, L.; MOSRATI, R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p.1670-1677, 2007.

MANSOUR, H.B.; HOUAS, I.; MONTASSAR, F.; GHEDIRA, K.; BARILLIER, D.; MOSRATI, R.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Alteration of *in vitro* and acute *in vivo* toxicity of textile dyeing wastewater after chemical and biological remediation. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.19, n.7, p.2634-2643, 2012.

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

MATHUR, N.; BHATNAGAR, P.; BAKRE, P. Assessing mutagenicity of textile dyes from Pali (Rajasthan) using Ames bioassay. **Applied Ecology and Environmental Research**, v.4, n.1, p. 111-118, 2005.

MATTHEWS, R.D.; BOTTOMLEY, L.A.; PAVLOSTATHIS, S.G. Palladium-catalyzed hydrogen reduction and decolorization of reactive phthalocyanine dyes. **Desalination**, v.248, n.1–3, p.816–825, 2009

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

MEINKE, M.; ABDOLLAHNIA, M.; GÄHR, F.; PLATZEK, T.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Migration and penetration of a fluorescent textile dye into the skin – *in vivo* versus *in vitro* methods. **Experimental Dermatology**, v.18, p.789-792, 2009.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.399, n.2, p.135-147, 1998.

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

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.455, p.29-60, 2000.

NASCIMENTO, L.P.; RAFFIN, R.P.; GUTERRES, S.S. Aspectos atuais sobre a segurança no uso de produtos antiperspirantes contendo derivados de alumínio. In: **Infarma**, v.16, n.7-8, p.66-72, 2004.

NEVES, J.D; CRESPIM, L. Curso de Engenharia Têxtil. Tratamentos Têxteis: **Tingimento Reativo**. Universidade Estadual de Maringá. Campus Regional de Goioerê, 2000.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm, Acute Toxicity Tests (Filter Paper Test and Artificial Soil Test) (Guideline No. 207), Paris, 1984.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, Fish, Early Life Stage Toxicity Test (Guideline 210), p. 9, 1992.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD] Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the final ring test of the *Daphnia magna* reproduction test organization. General Distribution OCDE/GD, v.19, p. 1-190, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages (Guideline 212), p. 9, 1998.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guideline for testing of chemicals, *Daphnia* sp. acute immobilization test (Guideline No. 202), France, 2004.

OLIVEIRA, G.A.R., FERRAZ, E.R.A., CHEQUER, F.M.D., GRANDO, M.D., ANGELI, J.P.F., TSUBOY, M.S., MARCARINI, J.C., MANTOVANI, M.S., OSUGI, M.E., LIZIER, T.M., ZANONI, M.V.B, OLIVEIRA, D.P. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. **Mutation Research**, v.703, p.200–208, 2010.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p.291-298, 1984.

PALÁCIO, S.M.; NOGUEIRA, D.A.; MANENTI, D.R.; MÓDENES, A.N.; QUIÑONES, F.R.E.; BORBA, F.H. Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca Sativa* e *Artemia Salina*. **Engvista**, v.14, n.2, p.127-134, 2012.

PEREIRA, W.S.; FREIRE, R.S. Ferro zero: Uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes. **Química Nova**, v.28, p.130-136, 2005.

PETERSEN, A. B., GNIADECKI, R., VICANOVA, J., THORN, T., WULF, H. C. Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.59, p.123–131, 2000.

PHILLIPS, J.L.; IVASCHUK, O. ISHIDA-JONES, T.; JONES, R.A.; CAMPBELL-BEACHLER, M.; HAGGREN, W. DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields in vitro. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v.45, p.103–110, 1998.

PICCOLI, H.H. **Determinação do comportamento tintorial de corantes naturais em substrato de algodão**: Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PIRET, J.P.; ARNOULD, T.; FUKS, B. CHATELAIN, P.; REMACLE, J.; MICHIELIS, C. Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 611-620, 2004.

PORTAL TEXTILIA.NET: O maior conteúdo da cadeia têxtil. **História da Indústria Têxtil no Brasil**. Disponível em: <http://www.textilia.net/sitenovo/news_principal_detalle.asp?PLC_cng_ukey=STAR_STAR__0ST0Y18XF&PLC_map_001_c=050102> Acesso em: 28 de Janeiro de 2010.

PRZYSTAŚ, W.; ZABŁOCKA-GODLEWSKA, E.; GRABIŃSKA-SOTA, E. Biological Removal of Azo and Triphenylmethane Dyes and Toxicity of Process By-Products. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.223, n.4, p.1581-1592, 2012.

RAFII, F.; HALL, J.D.; CERNIGLIA, C.E. 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**, London, v. 35, p. 897-901, 1997.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGION, M.A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 444, p. 175–180, 1999.

RAJAGURU, P.; KALPANA, R.; HEMA, A.; SUBA, S.; BASKARASETHUPATHI, B.; KUMAR, P.A.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.38, n.4, p.316-22, 2001.

REVISTA ELETRÔNICA DE QUÍMICA (QMCWEB), Florianópolis (Ano 4). **CORANTES: A Química nas Cores**. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>> Acesso em: 01 de Outubro de 2012.

ROBINSON, T.; CHANDRAN, B.; NIGAM, P. Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. **Water Research**, v. 36, p. 2824-2830, 2002.

ROBINSON, T.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

SALLES, P.T.F.; PELEGRINI, N.N.B.; PELEGRINI, R.T. Tratamento eletroquímico de efluentes industrial contendo corante reativo. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 3, p. 25-40, 2006.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. Em: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. In: **Mutagênese Ambiental**. Canoas:Ulbra, 2003, p.201-223.

SALVATORE, M.,D.; CARAFA, A.M.; CARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. **Chemosphere**, v.73, n.9, p.1461-4., 2008.

SANTELLI, G.M.M. Mutagênese e Carcinogênese. In Seizi Oga. **Fundamentos de Toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003, v. 1, p. 76-88.

SANTOS, A.B.; CERVANTES, F.J.; VAN LIER, J.B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 98, p.2369–2385, 2007.

SAUER, T.P.; CASARIL, L.; OBERZINER, A.L.; JOSÉ, H.J.; MOREIRA, R.F. Advanced oxidation processes applied to tannery wastewater containing Direct Black 38--elimination and degradation kinetics. **Journal Hazard Materials**, v.135,n.1-3, p.274-279, 2006.

SEIBERT, H.; BALLS, M.; FENTEM, J.H.; BIANCHI, V.; CLOTHIER, H.; DIERICKX, P.J.; EKWALL, B.; GARLE, M.J.; LECHÓN, M.J.G.; GRIBALDO, L.; GÜLDEN, M.; LIEBSCH, M.; RASMUSSEN, E.; ROGUET, R.; SHRIVASTAVA, R.; WALUM, E. acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. **ATLA**, v.24, p. 499-510, 1996.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.; VOELKER D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 15, n.5, p.394-404, 2008.

SMITH, G.; KANAWA, R.T. Some Traditional Colourants of Maori and other Cultures. **Chemistry in New Zealand**, v.72, n.4, p.127-131, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGÊNESE E TERATOGENÊNESE AMBIENTAL (SBMCTA). São Paulo, 2004. UMBUZEIRO, G.A.;I.;VARGAS, V.M.F.; FELZENSZWALB, I.; HENRIQUERS, J.A.P.; VARANDA, E. **Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente**. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma). (Série de Documentos, 1). Disponível em <<http://www.sbmcta.org.br>>. Acesso em: 03/10/2007.

SOUZA, B.S. **Avaliação do processo H₂O₂/UV como pós-tratamento e remoção da atrazina de um efluente secundário de ete para fins de reuso**: Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Rio de Janeiro, 2011.

SPADARO, J.T.; GOLD, M.H.; RENGANATHAN, V. Degradation of Azo Dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.8, p.2397-2401, 1992.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society (London)**, v.83, n.1, p.13-34, 2008.

SPEIT, G. How to assess the mutagenic potential of cosmetic products without animal tests?. **Mutation Research**, v.678, p.108–112, 2009.

STAHLMANN, R.; WEGNER, M.; RIECKE, K.; KRUSE, M.; PLATZEK, T. Sensitising potential of four textile dyes and some of their metabolites in a modified local lymph node assay. **Toxicology**, v.219, n.1-3, p.113-23, 2006.

STEFANIAK, A.B.; HARVEY, C.J. Dissolution of materials in artificial skin surface film liquids. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.1265–1283, 2006.

TATARAZAKO, N.; ODA, S. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. **Ecotoxicology**, v.16, p.197-203, 2007.

TEIXIDÓ, E.; PIQUÉ, E.; GÓMEZ-CATALÁN, J.; LLOBET J.M. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. **Toxicology in Vitro**, v.27, n.1, p.469-78, 2013.

TICE, R.R., AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G. A.; RIBEIRO, L. R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1650-1655, 2007.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the *Salmonella* assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005a.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H.; OLIVEIRA, D.P.; TERAOKA, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Crataieira river. **Chemosphere**, v. 60, p. 55-64, 2005b.

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: **Mutagênese Ambiental**, Eds. Lucia Regina Ribeiro, Daisy Maria Fávero Salvadori & Edmundo Kanan Marques, Editora da ULBRA, 2003, Cap. 4, pp. 81-112.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200. *Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test*. EPA 712-C-96-154, 1996.

VACCHI, F.I.; ALBUQUERQUE, A.F.; VENDEMIATTI, J.A.; MORALES, D.A.; ORMOND, A.B.; FREEMAN, H.S.; ZOCCOLO, G.J.; ZANONI, M.V.; UMBUZEIRO, G. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. **Science of the Total Environment**, v.442, p.302–309, 2013.

VERMA Y. Acute toxicity assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using *Daphnia magna* bioassay. **Toxicology and Industrial Health**, v.24, n.7, p.491-500, 2008.

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

WANG, Y.; WU, S.; CHEN, L.; WU, C.; YU, R.; WANG, Q.; ZHAO, X. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v.88, p.484–491, 2012.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, v.437, p.105–112, 1999.

WYLLIE, A.H. Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**, v.53, p.451–465, 1997.

Apêndices

8. APÊNDICES

8.1 Apêndice A - Resultados de cada experimento do Ensaio do Cometa em fibroblastos e queratinócitos de pele humana para o corante Direct Black 38 original e após extração por lixiviação com suor sintético.

TABELA 8. Resultados de cada repetição do ensaio do cometa em cultura de fibroblastos de pele humana após 3 horas de exposição ao corante Direct Black 38 na forma original e extraído por lixiviação com suor sintético. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições.

Direct Black 38 (µg/mL)	Tail Moment ^a			Tail Moment (média ± DP)
	1 ^a R (média)	2 ^a R (média)	3 ^a R (média)	
Original				
CN	2,72	1,91	1,45	2,03 ± 0,64
CP	13,60	11,11	8,36	11,02 ± 2,62**
0,1	2,40	2,91	1,73	2,35 ± 0,59
1,0	3,17	2,12	1,97	2,42 ± 0,65
10,0	2,46	1,89	2,04	2,13 ± 0,30
100,0	4,36	3,71	2,20	3,93 ± 0,38
700,0	1,87	3,56	1,61	2,35 ± 1,06
Extraído				
CN	6,53	4,04	1,45	4,01 ± 2,54
CP	44,22	40,29	31,96	38,82 ± 6,26***
0,0059	6,87	3,48	2,98	4,44 ± 2,12
0,0590	6,57	2,90	2,38	3,95 ± 2,29
0,5900	4,59	3,30	2,53	3,48 ± 1,04
5,9000	5,01	5,96	2,17	4,39 ± 1,97

^a100 células foram analisadas por cultura, utilizando o software *Comet IV* (Perceptive Instruments Ltd, UK). ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles negativos. CN: controle negativo, PBS (original) e solução obtida com o branco da extração em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação (extraído); H₂O₂: controle positivo, 70 μM (original - 15 min.) e 70 μM (extraído - 7 min).

TABELA 9. Resultados de cada repetição do ensaio do cometa em cultura de queratinócitos de pele humana após 3 horas de exposição ao corante Direct Black 38 na forma original e extraído por lixiviação com suor sintético. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (DP) de três repetições.

Direct Black 38 (µg/mL)	Tail Moment ^a			Tail Moment (média ± DP)
	1ªR (média)	2ªR (média)	3ªR (média)	
Original				
CN	3,76	5,03	3,15	3,98 ± 0,96
CP	21,91	22,38	21,41	21,90 ± 0,49***
0,1	7,26	6,53	5,19	6,32 ± 1,05
1,0	5,76	5,01	5,91	5,56 ± 0,49
10,0	6,45	5,34	5,31	5,70 ± 0,65
100,0	6,87	6,50	4,33	5,90 ± 1,37
700,0	5,01	7,00	4,98	5,66 ± 1,16
Extraído				
CN	3,39	3,54	4,37	3,76 ± 0,53
CP	21,91	16,35	21,41	19,89 ± 3,83***
0,0059	3,69	2,23	3,48	3,13 ± 0,78
0,059	3,33	2,52	4,18	3,34 ± 0,83
0,59	3,83	2,08	4,31	3,41 ± 1,18
5,9	3,89	2,18	4,65	3,57 ± 1,26

^a100 células foram analisadas por cultura, utilizando o software *Comet IV* (Perceptive Instruments Ltd, UK). *** $p < 0,01$ estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles negativos. CN: controle negativo, PBS (original) e solução obtida com o branco da extração em pH 8,0 à 42°C e 8 horas de incubação (extraído); H₂O₂: controle positivo, 60 μM (7 min).

8.2 Apêndice B - Resultados do Ensaio de Mutagenicidade com *Salmonella*/microsoma com o corante Direct Black 38 original e após extração por lixiviação com suor sintético realizado em triplicata.

TABELA 10. Número de revertentes por placa para o corante Direct Black 38 original e extraído por lixiviação com suor sintético testado com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella* na presença e ausência de ativação metabólica exógena (S9). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (DP) de ensaios realizados em triplicata.

Direct Black 38 ($\mu\text{g/mL}$)	Número de Revertentes			
	TA98 (média $\pm$ DP)		TA100 (média $\pm$ DP)	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Original				
CN	24,33 $\pm$ 2,9	34,67 $\pm$ 5,5	210,00 $\pm$ 28,6	225,00 $\pm$ 11,3
CP	486,00 $\pm$ 127,3	757,00 $\pm$ 120,2	1026,00 $\pm$ 393,1	2520,00 $\pm$ 124,5
5	25,67 $\pm$ 2,1	36,33 $\pm$ 0,7	209,33 $\pm$ 19,3	233,0 $\pm$ 19,5
50	26,33 $\pm$ 0,6	39,67 $\pm$ 4,5	226,33 $\pm$ 22,5	241,7 $\pm$ 13,0
100	30,50 $\pm$ 3,5	79,00 $\pm$ 1,4**	201,33 $\pm$ 24,6	243,0 $\pm$ 11,3
250	33,37 $\pm$ 4,0	101,50 $\pm$ 0,7**	189,00 $\pm$ 18,4	269,5 $\pm$ 24,7
500	27,00 $\pm$ 3,0	152,33 $\pm$ 11,1**	206,33 $\pm$ 8,1	280,3 $\pm$ 27,7
5000	22,67 $\pm$ 3,1	32,67 $\pm$ 9,5	211,50 $\pm$ 30,4	297,0 $\pm$ 1,4**
25000	33,00 $\pm$ 6,1	29,00 $\pm$ 2,8	211,00 $\pm$ 36,8	233,0 $\pm$ 19,5
Extraído				
CN	23,2 $\pm$ 1,1	36,8 $\pm$ 3,6	197,4 $\pm$ 16,0	269,50 $\pm$ 21,9
CP	668,0 $\pm$ 175,4	587,0 $\pm$ 77,8	896,00 $\pm$ 22,6	1598,00 $\pm$ 93,3
0,00059	35,7 $\pm$ 5,5	34,7 $\pm$ 3,5	201,0 $\pm$ 40,6	188,6 $\pm$ 15,8
0,00590	34,0 $\pm$ 9,2	34,7 $\pm$ 1,5	211,3 $\pm$ 20,1	194,0 $\pm$ 22,3
0,05900	34,0 $\pm$ 5,6	32,7 $\pm$ 5,0	210,0 $\pm$ 20,0	188,7 $\pm$ 24,9
0,59000	38,7 $\pm$ 5,1	32,0 $\pm$ 5,0	212,5 $\pm$ 10,7	187,0 $\pm$ 20,9
5,90000	36,3 $\pm$ 8,3	32,0 $\pm$ 6,0	205,3 $\pm$ 8,1	183,0 $\pm$ 13,4

** $p < 0,05$ são estatisticamente diferentes em relação aos respectivos controles negativos. CN: controle negativo, PBS (original) e solução obtida com o branco da extração em pH 8,0 sem histidina à 42°C e 8 horas de incubação (extraído). CP: controle positivo; Ausência de S9: 4-nitroquinolina-1-óxido (0,5 $\mu\text{g/placa}$) e Presença de S9: 2-aminoantraceno (2,5 $\mu\text{g/placa}$)