UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Comparação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise em relação à cloração química convencional na redução da mutagenicidade de azo corantes empregando o ensaio de micronúcleos

Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Comparação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise em relação à cloração química convencional na redução da mutagenicidade de azo corantes empregando o ensaio de micronúcleos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Ribeirão Preto
2010

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
Comparação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise em relação à cloração química convencional na redução da mutagenicidade de azo corantes empregando o ensaio de micronúcleos. Ribeirão Preto, 2010
101 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientadora: Oliveira, Danielle Palma

1. Chlorination. 2. Photoelectrocatalysis. 3. Disperse Red 1. 4. Disperse Orange 1. 5. Disperse Red 13. 6. Micronucleus. 7. $HepG_2$ cells.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Título do trabalho: Comparação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise em relação à cloração química convencional na redução da mutagenicidade de azo corantes empregando o ensaio de micronúcleos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedicatória

À minha família, pelo apoio, carinho, paciência e compreensão. Enfim, por nunca me deixarem desistir de um sonho e por me ensinarem o que é determinação e dedicação.

Amo vocês!!!

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade, força e determinação para atingir este objetivo, e por sempre me mostrar com sabedoria novos caminhos.

Aos meus pais, José Augusto e Célia, meus eternos exemplos de coragem, humildade e dedicação, por sempre me incentivarem em todas as minhas escolhas, pelo amor incondicional e, sobretudo, 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, pelo companheirismo, amor, paciência, compreensão e amizade, mas, especialmente, pelo incentivo e por me ensinar a acreditar na minha capacidade.

À minha amiga, Renata, com quem compartilho grande parte da minha vida, pela amizade consolidada, alegria contagiante, pelo companheirismo e pelos conselhos pessoais e profissionais.

Às minhas amigas Giseli, Pammela e Natalícia pela amizade verdadeira, dedicação, torcida, carinho e pelos momentos de descontração.

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, compreensão e oportunidade de aprendizado além da contribuição científica ao longo da realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório Eduardo, Thalita, Rafael e Marcella, pela receptividade, amizade, atenção, sugestões e disposição em ajudar. De um modo especial, agradeço às minhas amigas Farah e Elisa, pela amizade construída, pelo auxílio incondicional, pela sabedoria compartilhada, pelo carinho e dedicação com que me ajudaram tantas vezes na execução de experimentos, enfim, vocês foram fundamentais na concretização deste trabalho!

Ao Laboratório de Bioquímica, especialmente à Ana Cristina, Fernando e Felipe pela paciência, apoio, disponibilidade em ajudar e pelos conhecimentos compartilhados.

Às secretárias da Pós-graduação, Ana, Rosana e Rossana pelo carinho a mim dispensado, pela dedicação e competência com os serviços prestados.

À CAPES pelo apoio financeiro.

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

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre”

(Louis L. Amour)

“A ação nem sempre traz felicidade, mas não há felicidade sem ação”

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

OLIVEIRA, G.A.R. **Comparação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise em relação à cloração química convencional na redução da mutagenicidade de azo corantes empregando o ensaio de micronúcleos.** 2010. 101f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 são amplamente utilizados para o tingimento de fibras e são mutagênicos para o ensaio de *Salmonella*/microssoma e para o ensaio de micronúcleos. O aumento da complexidade e dificuldades para o tratamento de efluentes têxteis tem levado à busca constante de novas metodologias para o tratamento destes rejeitos. A cloração é um método amplamente empregado para a desinfecção de águas e efluentes, mas também para remover ou reduzir a cor do efluente a fim de atender o padrão de emissão da legislação brasileira. Porém, muitos trabalhos mostram que este tratamento muitas vezes não é capaz de remover a mutagenicidade dos corantes e em alguns casos pode até aumentar a toxicidade da amostra. Já a fotoeletrocatálise, aparentemente, é eficiente tanto na degradação desses compostos em amostras aquosas como na redução da atividade mutagênica, como demonstraram alguns ensaios preliminares. Este trabalho tem como objetivo a avaliação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise na remoção da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 presentes em amostras aquosas em comparação à cloração química convencional utilizando o teste de micronúcleos (MNs) em células $HepG_2$. Os resultados demonstraram que a freqüência de MNs induzidos pelas diferentes concentrações testadas das soluções dos corantes estudados não foram significativamente diferentes do controle negativo. Nossos dados também revelaram que os índices de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com os três corantes após a cloração e fotoeletrocatálise também não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos seus respectivos controles negativos. A análise comparativa dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 clorados e fotoeletrocatalisados com os corantes originais estudados pelo nosso grupo (CHEQUER, 2008; CHEQUER et al., 2009) mostrou uma diminuição no número de MNs indicando que após os tratamentos houve a remoção da mutagenicidade a partir da concentração de 1,0 µg/mL para os três corantes estudados. Portanto, podemos concluir que a cloração química convencional e a fotoeletrocatálise, nas condições testadas, são eficientes na remoção da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 em relação à indução de micronúcleos.

Palavras-chave: Cloração, Fotoeletrocatálise, Disperse Red 1, Disperse Orange 1, Disperse Red 13, Micronúcleos, Células $HepG_2$.

ABSTRACT

OLIVEIRA, G.A.R. **Comparison of the efficiency of the treatment by photoelectrocatalysis in relation to conventional chemical chlorination in the reduction of the mutagenicity of azo dyes using micronucleus assay.** 2010. 101f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The azo dyes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 and Disperse Red 13 are widely used in dyeing processes and are mutagenic for *Salmonella*/microsome and micronucleus assays. The increasing of the complexity and difficulties for treatments of textile effluents has led to a constant search for new methodologies for the treatment of these wastewaters. Chlorination is a method extensively used for water and wastewaters disinfection and to remove or reduce the color of effluents in order to respect the standard of discharges issued by the Brazilian legislation. However, a lot of studies have shown that this treatment is not often able to remove the mutagenicity of the dyes, and in some cases it may even increase the toxicity of the sample. On the other hand, photoelectrocatalysis is apparently efficient both in the degradation of these compounds in aqueous samples and in reduction of the mutagenic activity, as demonstrated by some preliminary assays. This study aims to evaluate the efficiency of the photoelectrocatalysis treatment in the removal of the mutagenicity of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 and Disperse Red 13 present in aqueous sample in comparison to conventional chemical chlorination using the micronucleus test (MNs) in $HepG_2$ cells. The results showed that the frequency of MNs induced by different tested concentrations of the solutions of the studied dyes were not significantly different from the negative control. Our data also revealed that the cytokinesis-block proliferation index (CPBI) in cultures of $HepG_2$ cells treated with the three dyes after chlorination and photoelectrocatalysis also showed no statistical differences related to the their respective negative controls. The comparative analysis of azo dyes chlorinated and photoelectrocatalysed Disperse Red 1, Disperse Orange 1 and Disperse Red 13 with the original dyes studied by our group (CHEQUER, 2008; CHEQUER et al., 2009) showed a decrease in the number of MNs indicating that after the treatments occurred the removal of the mutagenicity potencial at concentration of 1,0 µg/mL for the three dyes studied. Therefore, we conclude that conventional chemical chlorination and photoelectrocatalysis, under the conditions tested, are effective in removing of the mutagenicity of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 and Disperse Red 13 related to induction of micronucleus.

Keywords: Chlorination, Photoelectrocatalysis, Disperse Red 1, Disperse Orange 1, Disperse Red 13, Micronucleus, $HepG_2$ Cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativado, tipicamente empregado para o tratamento de efluente têxtil 07

Figura 2. Esquema representativo da partícula de um semicondutor, onde BV é a banda de valência, BC é a banda de condução, *hv* é a energia aplicada 11

Figura 3. Representação esquemática do reator fotoeletrocatalítico contendo: (1) eletrodo de referência; (2) eletrodo de trabalho (fotoanodo de Ti/TiO_2); (3) bulbo de quartzo; (4) ar comprimido; (5) contra-eletrodo (rede de platina); (6) e (7) circulação de água; (8) Lâmpada germicida de 125 W Philips, operando como fonte de luz UV (315-400 nm) 13

Figura 4. Células binucleadas (BN) com bloqueio de citocinese sem MN (A) e com MN, marcado com seta (B) 16

Figura 5. A expressão do micronúcleo em uma célula em divisão, durante a exposição ao um agente mutagênico 18

Figura 6. Estrutura química dos azo corantes (A) Disperse Red 1, (B) Disperse Orange 1, (C) Disperse Red 13 25

Figura 7. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações de benzopireno. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=2) ... 34

Figura 8. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações de benzopireno. Em cada experimento foram analisadas 500 células (n=2) 35

Figura 9. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações solução clorada do corante Disperse Red 13. Os resultados expressam o número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=1) ... 38

Figura 10. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Red 13. Em cada experimento foram analisadas 500 células (n=1) 38

Figura 11. Método de exclusão pelo trypan Blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com o corante Disperse Red 1 após cloração 39

Figura 12. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com o corante Disperse Orange 1 após cloração... 40

Figura 13. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Red 13 após cloração 40

Figura 14. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Red 1 após fotoeletrocatálise 41

Figura 15. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Orange 1 após fotoeletrocatálise 41

Figura 16. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise 42

Figura 17. Fotomicrografias de células $HepG_2$ com aparência binucleada sem a presença de micronúcleo (A) e na qual foi induzida a formação de micronúcleo (B), obtidas no presente trabalho 43

Figura 18. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Red 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3) 45

Figura 19. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Orange 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3) 46

Figura 20. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Red 13. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3) 46

Figura 21. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 1 após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células 47

Figura 22. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Orange 1 após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células 47

Figura 23. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 13 após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células 48

Figura 24. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução clorada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3) 49

Figura 25. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução clorada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3) 49

Figura 26. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células..... 50

Figura 27. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al, 2009) e após cloração. Os resultados expressam a media e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células..... 50

Figura 28. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e da solução clorada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 51

Figura 29. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células 52

Figura 30. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução fotoeletrocatalisada do corante Disperse Red 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 55

Figura 31. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução fotoeletrocatalisada do corante Disperse Orange 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3) 56

Figura 32. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução fotoeletrocatalisada do corante Disperse Red 13. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3) 56

Figura 33. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 1 após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células 57

Figura 34. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Orange 1 após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células 58

Figura 35. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células 58

Figura 36. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 60

Figura 37. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 60

Figura 38. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e da solução fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 61

Figura 39. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células..... 62

Figura 40. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009) e após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células..... 62

Figura 41. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células..... 63

Figura 42. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009), da solução clorada e fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 65

Figura 43. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009), da solução clorada e fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 66

Figura 44. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008), da solução clorada e fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3)..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleos, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações de benzopireno (B[a]P) (n=2). 34

Tabela 2 - Resultados obtidos em experimentos preliminares para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações das soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração. 37

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleos em três repetições, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração 44

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleos em três repetições, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química
B(a)P	Benzo(a)pireno
BDCP	Black Dye Commercial Product
BC	Banda de condução
BN	Célula binucleada
BPDE	7,8-dihidroxi-9,10-epóxido-7,8,9,10-tetrahidrobenzopireno
BV	Banda de Valência
CBMN	Teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese
C(-)	Controle negativo
CG/FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CG/MS	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa
CHO	Linhagem celular derivada do ovário de hamster chinês
CYP-450	Citocromo P-450
DBPs	Disinfection by-products
DL_{50}	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
Eapp	Potencial positivo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
e^-/h^+	Par elétron/lacuna
ETA	Estação de Tratamento de Água

ETAD	The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments and Manufacturers
h^+	Lacuna
$HepG_2$	Linhagem celular derivada de hepatoblastoma
hv	Energia aplicada/ iluminação ultra-violeta
IPBC	Índice de Proliferação do Bloqueio da Citocinese
MEM	Minimum Essential Medium
MN	Micronúcleo
-N=N-	Grupamento azo
Non-ClPBTA	PBTA não-clorado
•OH	Radical hidroxila
PBS	Tampão salina-fosfato
PBTA	2-fenilbenzotriazol
POAs	Processos Oxidativos Avançados
q.s.p	quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
SABESP	Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo
SBF	Soro Bovino Fetal
SHE	Célula de embrião de hamster sírio
TOC	Carbono Orgânico Total
THMs	Trialometanos
UV	Ultra-violeta
V79	Linhagem celular derivada de fibroblastos de pulmão

SUMÁRIO

Resumo i

Abstract ii

Lista de figuras iii

Lista de tabelas viii

Lista de abreviaturas e siglas ix

1. INTRODUÇÃO 01

1.1 A IndústriaTêxtil e a Contaminação Ambiental 01

1.2 Toxicidade dos Azo corantes 03

1.3 Tratamentos dos Sistemas Aquosos 06

1.3.1 Sistema de Desinfecção Convencional com Cloro 08

1.3.2 Processos Oxidativos Avançados (POAs) 10

1.4. Teste de Micronúcleos em Células $HepG_2$ 14

1.4.1 Mutações. 14

1.4.2 Micronúcleos (MNs) 16

1.4.2.1 Teste de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN) 17

1.4.2.2 Critérios estabelecidos para realizar o teste de micronúcleos 19

1.4.2.3 Critérios para o reconhecimento de micronúcleos 20

1.4.3 Células $HepG_2$ 20

2. OBJETIVOS 22

3. MATERIAL E MÉTODOS 23

3.1 Material 23

3.1.1 Soluções utilizadas 23

3.1.2 Corantes estudados 25

3.2 Métodos 26

3.2.1 Teste de Micronúcleos em Células $HepG_2$ 26

3.2.1.1 Protocolo para cultivo e manutenção das células $HepG_2$ 26

3.2.1.2 Protocolo para realizar o ensaio de micronúcleos em cultura de células $HepG_2$ 27

3.2.2. Avaliação da Viabilidade Celular 29

3.2.2.1 Teste de viabilidade celular pela Técnica de Exclusão do Corante Trypan Blue 30

3.2.3 Análise Estatística 31

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 32

4.1 Determinação da concentração empregada como controle positivo 32

4.2 Determinação das concentrações dos corantes a serem estudadas 35

4.3 Teste de viabilidade celular das soluções dos corantes após cloração e fotoeletrocatálise 39

4.4 Avaliação da mutagenicidade dos corantes após a cloração..... 42

4.4.1 Comparação do teste de micronúcleos dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 originais com as soluções aquosas dos mesmos corantes após tratamento por cloração..... 48

4.5 Avaliação da mutagenicidade dos corantes após a fotoeletrocatálise..... 53

4.5.1 Comparação do teste de micronúcleos dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 originais com as soluções aquosas dos mesmos corantes após tratamento por fotoeletrocatálise 59

4.6 Comparação dos efeitos dos tratamentos por cloração e fotoeletrocatálise na mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13..... 63

5. CONCLUSÕES 67

6. REFERÊNCIAS 69

APÊNDICES 77

Apêndice A: Resultados de cada experimento do Teste de MN em células $HepG_2$ para determinação da concentração empregada como controle positivo (Benzopireno) 77

Apêndice B: Resultados de cada experimento do Teste de MN em células $HepG_2$ para os corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração 79

Apêndice C: Resultados de cada experimento do Teste de MN em células $HepG_2$ para os corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise 85

ANEXOS 91

Anexo I: CHEQUER, 2008 91

Anexo II: CHEQUER et al., 2009 97

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Indústria Têxtil e a Contaminação Ambiental

O desenvolvimento e as conquistas do homem contemporâneo desencadeiam condições para a melhoria da qualidade de vida, ao mesmo tempo em que aumentam os fenômenos de contaminação ambiental. O aumento populacional nas grandes cidades tem gerado quantidades exageradas de resíduos, os quais quando não gerenciados por sistemas eficazes podem prejudicar a qualidade de vida das comunidades (SALLES, PELEGRINI, PELEGRINI, 2006).

As águas superficiais, tais como rios, lagos e mares recebem grandes quantidades de rejeitos de fontes industriais, agrícolas e domésticas. Estas mesmas águas contaminadas por muitos compostos desconhecidos são usadas para produção de água para consumo, irrigação e atividades recreacionais. Assim, a poluição das águas é um sério problema de saúde pública e para o ecossistema aquático (OHE, WATANABE, WAKABAYASHI, 2004).

A preocupação com este recurso natural é crescente no mundo todo, considerando que as fontes de água disponíveis para consumo estão cada vez mais escassas. Embora a economia de água em processos produtivos venha 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. Como exemplo, pode-se citar a previsão feita pela Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (SABESP), que estima que já em 2010 a demanda de água será superior a capacidade hídrica dos mananciais do Estado (KUNZ et al., 2002; COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO [SABESP], 2009).

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 dos ecossistemas aquáticos, as indústrias têxteis, especialmente o setor de tingimento; e as indústrias de impressão

são as maiores contribuidoras (CARNEIRO et al., 2004). O setor têxtil ainda consome uma grande quantidade de água, uma vez que, para o processamento de cada quilograma de algodão são consumidos em média 200 litros de água (GUARATINI, ZANONI, 2000; CARNEIRO et al., 2004), que na maioria das vezes não é reutilizada.

Aproximadamente, 10.000 diferentes corantes e pigmentos estão disponíveis comercialmente para atender à demanda do mercado consumidor em relação à diversidade de cores e tonalidades, à resistência da cor durante as exposições à luz, à lavagem e à transpiração (SPADARO, GOLD, RENGANATHAN, 1992; RAJAGURU et al., 1999; ROBINSON et al., 2001) e, cerca de 800.000 toneladas desses agentes são consumidas anualmente em todo o mundo (MANSOUR et al., 2007), sendo 26.500 toneladas somente no Brasil (KUNZ et al., 2002).

Estima-se também que cerca de 15 a 20% da produção mundial de corantes é perdida para o meio ambiente durante a síntese, processamento ou aplicação dos mesmos, porém a principal fonte desta perda corresponde à incompleta fixação dos corantes, durante a etapa de tingimento das fibras têxteis (GUARATINI, ZANONI, 2000).

Dessa forma, o efluente da indústria têxtil é uma mistura complexa de resíduos de corantes, eletrólitos, ajustadores de pH, surfactantes, sais, metais, entre outros (ZOLLINGER, 1991) e, portanto, o que chega aos corpos d’água são efluentes com alta carga orgânica e demanda bioquímica de oxigênio, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, forte coloração e pouca biodegradabilidade (PEREIRA, FREIRE, 2005). De toda a carga orgânica presente no efluente, o maior problema está representado pelas moléculas de corantes, pois grande parte destas mostra-se resistente ao tratamento biológico convencional (SALLES, PELEGRINI, PELEGRINI, 2006). Adicionalmente, devido ao seu grande parque industrial instalado, o setor têxtil gera grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação (KUNZ et al., 2002).

O descarte destes compostos em ecossistemas aquáticos dificulta a penetração dos raios solares sobre a água provocando alterações nos ciclos biológicos da biota aquática por afetar principalmente os processos de fotossíntese e oxigenação dos corpos d’água (KUNZ et al., 2002; ROBINSON, CHANDRAN,

NIGAM, 2002; PEREIRA, FREIRE, 2005), como também pode atingir reservatórios e estações de tratamento de água acarretando problemas à saúde da população.

Um problema adicional é a modificação destes poluentes em ambientes aquáticos naturais ou no organismo humano, cujo produto pode ser mais nocivo que o próprio corante por suas propriedades carcinogênicas e potencialidade mutagênica (HUNGER, 1994; ZANONI et al., 1999). Devido a estas implicações ambientais, novas tecnologias têm sido buscadas para a degradação ou imobilização destes compostos em efluentes têxteis (KUNZ et al., 2002).

Embora a indústria têxtil brasileira desempenhe um papel de inquestionável importância, destacando-se entre as principais atividades econômicas do país, existem argumentos que fazem com que a sua compatibilidade com as novas diretrizes ambientais seja continuamente questionada, principalmente em função do elevado impacto associado aos resíduos líquidos produzidos em operações de tingimento. Além disso, muitos dos compostos lançados no ambiente aquático após o tingimento são resistentes ao tratamento biológico convencional, o que faz com que a sua presença seja constante nos efluentes das estações de tratamento (SOUZA, ZAMORA, 2005).

Dentro do contexto da poluição que resulta da introdução de cor no meio ambiente, preocupa a massiva utilização de corantes da família azo, os quais podem levar à geração de subprodutos de reconhecido caráter mutagênico (CHUNG, STEVENS, CERNEGLIA, 1992; RAJAGURU et al., 1999; UMBUZEIRO et al., 2005a; SOUZA, ZAMORA, 2005).

1.2 Toxicidade dos Azo corantes

Os corantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria têxtil, nas impressões de papel e fotografia, nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos e de produtos petrolíferos (SPADARO, GOLD, RENGANATHAN, 1992; RAJAGURU et al., 1999; CHEQUER et al., 2009). O primeiro corante orgânico sintético foi o Mauve, obtido em 1856 por William H. Perkin, por meio da oxidação da fenilamina (anilina) com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA [ABIQUIM], 2006).

Atualmente existem milhares de corantes sintéticos sendo que os mais utilizados são aqueles que possuem o grupo azo como cromóforo. Esta classe de corantes tem participação em cerca de 65% das formulações comerciais empregadas nas indústrias de tingimento, borracha, esmaltes, plásticos e de impressão. Além da aplicação na indústria têxtil, estes compostos são bastante utilizados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de bebidas e de cosméticos (CHUNG, STEVENS, CERNIGLIA, 1992; RAFII, HALL, CERNIGLIA, 1997; GUARATINI, ZANONI, 2000).

Os azo corantes podem ser divididos em classes: monoazo, diazo, triazo, de acordo com a presença de um ou mais grupamentos azo (-N=N-) e são encontrados em várias categorias, como por exemplo, básico, direto, dispersivo e azóico (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004).

A grande preocupação relacionada aos azo compostos é devido a seus efeitos poluentes e tóxicos, e à grande resistência à degradação (ZOLLINGER, 1991; ROBINSON et al., 2001). Os riscos toxicológicos e ecológicos destas substâncias são baseados principalmente na avaliação de sua estrutura química, solubilidade, possíveis interações e rotas metabólicas (HUNGER, 1994).

Considerando que existem mais de 3.000 tipos de azo corantes disponíveis para os vários ramos industriais e que seus efeitos tóxicos e/ou mutagênicos estão intimamente relacionados com a natureza e a posição dos substituintes ligados ao grupo azo, existe a necessidade de realização da 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). Este fato é confirmado pelo seguinte exemplo: o 3-metoxi-4-amoniazobenzeno é um potente carcinógeno para ratos e extremamente mutagênico para bactérias, enquanto que o 2-metoxi-4-aminoazobenzeno é aparentemente não carcinogênico e fracamente mutagênico (HASHIMOTO et al., 1977).

A toxicidade aguda dos corantes não é relevante, cerca de 90% dos 4000 corantes avaliados pela ETAD (*Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments and Manufacturers*) 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). Entretanto, alguns desses corantes têm sido associados com a indução de câncer de bexiga em

humanos, sarcomas esplênicos, hepatocarcinomas e anomalias nucleares em animais experimentais, e com aberrações cromossômicas e atividade clastogênica em células de mamíferos (RAFII, HALL, CERNIGLIA, 1997; RAJAGURU et al., 1999; MANSOUR et. al., 2007; CHEQUER et al., 2009).

Segundo Tsuboy et al. (2007) a exposição humana aos azo compostos ocorre através do consumo de água contaminada ou do contato com a pele e, os metabólitos ativos dessa classe de corantes podem ser gerados nas células expostas através da ação de microrganismos da biota intestinal ou devido às atividades bacterianas na pele humana. Os azo corantes que entram no corpo humano pela ingestão podem ser metabolizados em aminas aromáticas pelas azoredutases dos microorganismos intestinais (CHUNG, STEVENS, CERNIGLIA,1992; RAFII, HALL, CERNIGLIA, 1997; TSUBOY et al., 2007). Se na molécula dos corantes ainda tiver um grupamento nitro, estes podem ser metabolizados pelas nitroredutases produzidas pelos mesmos microorganismos (UMBUZEIRO et al., 2005a).

Enzimas hepáticas de mamíferos e outros organismos podem também catalisar a clivagem redutiva da ligação azo (RAFII, HALL, CERNIGLIA, 1997; UMBUZEIRO et al. 2005a) e a nitroredução do grupo nitro, entretanto, tem sido demonstrado que as azoredutases da microbiota intestinal e as nitroredutases apresentam o mais importante papel neste tipo de metabolismo. Em ambos os casos, *N*-hidroxilaminas são formadas, e tais compostos são capazes de causar danos ao DNA. Se os corantes são completamente reduzidos a aminas aromáticas, podem ser oxidados também a N-hidroxiderivados pelas enzimas P-450. Além disso, os radicais N-hidroxi podem ser acetilados pelas enzimas, tais como *O*-acetiltransferase, gerando íons eletrofílicos de nitrogênio capazes de reagir com o DNA para formar adutos (UMBUZEIRO et al., 2005a).

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).

Em estudo prévio realizado por nosso grupo, a análise dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 pelo teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* comprovou o potencial mutagênico destes corantes, no ensaio utilizando as linhagens TA98, YG1041, TA100 e YG1042. Tal

mutagenicidade foi significativamente mais intensa com as linhagens TA98 e YG1041, o que mostra que o principal mecanismo de ação mutagênica apresentado pelos três corantes seja o deslocamento do quadro de leitura do DNA, tipo de dano identificado por essas linhagens. Além disso, a potência mutagênica com as linhagens superprodutoras de nitroredutase e o-acetiltransferase (YG1041 e YG1042) foi significativamente maior do que as respectivas linhagens que as originou (TA98 e TA100), o que mostra a importância da nitroredução e acetilação na ativação destes compostos. Porém, foi observada uma redução da mutagenicidade dos três compostos após a adição do sistema de metabolização exógena (S9) e, portanto, pode-se supor que a oxidação desses compostos via citocromo P-450 reduza a interação dos mesmos com o DNA (FERRAZ, 2008).

Chequer et al. (2009) também avaliaram a atividade mutagênica dos azo corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1, objetos de estudo deste trabalho, utilizando o ensaio de micronúcleos em linfócitos humanos e em células $HepG_2$ (células derivadas de hepatoblastoma, que expressam as atividades das enzimas de fases I e II da biotransformação). Segundo os autores, os dois corantes estudados aumentaram a frequência de micronúcleos tanto em linfócitos como em células $HepG_2$ com um efeito dose-dependente, confirmando que os azo compostos constituem uma importante classe de mutágenos ambientais.

1.3 Tratamentos dos Sistemas Aquosos

A utilização de corantes e pigmentos iniciou há milhares de anos, mas o desenvolvimento de modernas tecnologias para a produção de tecidos, incluindo o uso de muitas substâncias químicas sintéticas para melhorar os produtos, tornou-se um sério problema em relação ao lançamento direto e indireto de resíduos de tais produtos no ecossistema aquático (AL-SABTI, 2000).

Para resolver problemas de lançamento de resíduos industriais altamente coloridos, numerosas tentativas para descolorir efluentes têxteis têm sido propostas. Nos últimos anos, métodos alternativos para o tratamento de corantes têm sido investigados sob várias condições experimentais a fim de reduzir a cor e carga orgânica dos efluentes, incluindo métodos fotocatalíticos e oxidação química com

reagentes tais como: ozônio, peróxido de hidrogênio, ozônio/UV, peróxido de hidrogênio/UV e reagentes de Fenton (peróxido de hidrogênio + Fe (II)) (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004; OSUGI et al., 2006; BANDARA, WANSAPURA, JAYATHILAKA, 2007).

Em geral, na indústria têxtil os processos de tratamento de efluentes estão fundamentados na operação de sistemas físico-químicos de precipitação-coagulação, seguidos de tratamento biológico empregando sistemas de lodos ativados (Figura 1), que consistem na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica (KUNZ et al., 2002).

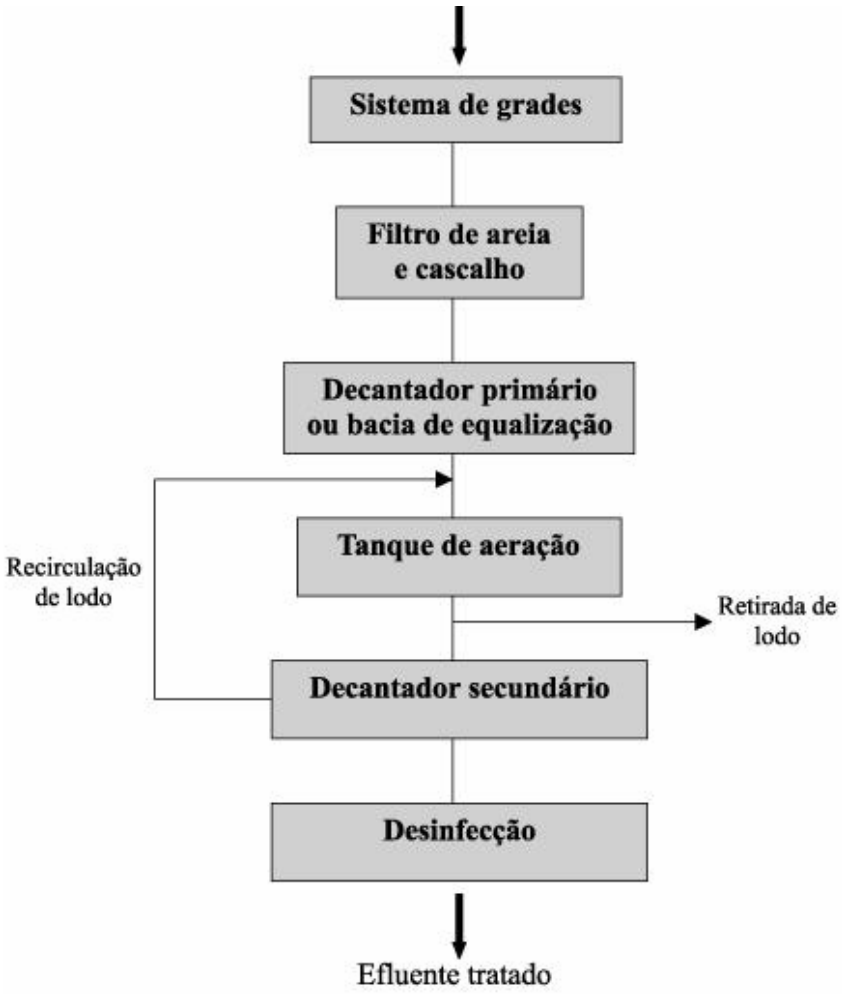


FIGURA 1. Esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativado, tipicamente empregado para o tratamento de efluente têxtil (KUNZ et al. 2002, modificado).

Entretanto, esses são processos não destrutivos, visto que eles apenas transferem compostos orgânicos da água para o lodo, causando poluição secundária (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004). Conseqüentemente, é necessária a regeneração dos materiais adsorvidos e pós-tratamento dos resíduos sólidos, que são operações de alto custo.

Além disso, devido à grande quantidade de compostos aromáticos presentes nas moléculas dos corantes e estabilidade dos mesmos, os métodos de tratamento biológico convencionais são ineficazes para a descolorização e degradação dos corantes, além da remoção da mutagenicidade dos mesmos (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004). Oliveira et al. (2007) e Mazzo et al. (2007) demonstraram que o efluente tratado lançado por uma indústria de tingimento continha grandes quantidades de corantes, além de aminas aromáticas, entre elas a benzidina, um carcinógeno humano.

1.3.1 Sistema de Desinfecção Convencional com Cloro

A cloração de suprimentos de água e águas poluídas serve primeiramente para destruir ou desativar microrganismos patogênicos no tratamento de água potável. Embora, sejam inquestionáveis os benefícios da cloração no que diz respeito à proteção da saúde humana, este processo gera compostos tóxicos (BAYO, ANGOSTO, LÓPEZ, 2009), chamado de produtos secundários de desinfecção ou *disinfection by-products* (DBPs) que são legislados pela Portaria n.518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). A formação dos DBPs ocorre quando a água bruta rica em matérias húmicas e fúlvicas é captada e clorada, o que mostra claramente a relação estreita entre a qualidade da água bruta e da água tratada correspondente. Embora os trialometanos (THMs) e ácidos haloacéticos constituam as duas maiores classes de DBPs identificados em água, nos últimos 30 anos mais de 600 DBPs diferentes têm sido relatados na literatura (RICHARDSON et al., 2007).

Além da formação de compostos tóxicos e mutagênicos, algumas características organolépticas da água, como sabor e odor, podem ser alteradas durante a cloração (SCONCE, 1982).

O cloro empregado na desinfecção de águas é gerado por meio de uma das mais importantes reações eletroquímicas industriais (ZANONI, SENE, ANDERSON, 2003;

OLIVEIRA et al., 2007). Em geral, a principal reação que ocorre em uma variedade de materiais anódicos é a oxidação de íons cloreto de acordo com a equação:

$$2\ Cl^- \rightarrow Cl_2 + 2e^-$$

O método de oxidação química utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl) ou cloro gás (Cl_2) baseia-se no ataque eletrofílico ao grupo amino e subseqüente clivagem do grupamento cromóforo (SLOKAR, MARECHAL, 1998). No caso de sistemas aquosos contendo corantes, o grupo amino da molécula do corante é atacado pelo Cl^+ e, este inicia e acelera o rompimento da ligação azo (grupamento cromóforo dos corantes estudados neste trabalho). Um aumento na descoloração é vista com o aumento da concentração de cloro (ROBINSON et al., 2001).

Ainda, no Brasil, o cloro juntamente com outros agentes branqueadores são adicionados aos efluentes altamente coloridos, a fim de atender os padrões de lançamento de efluentes estabelecidos pela Legislação Brasileira, que determina que o efluente não pode alterar as características do corpo receptor (BRASIL, 2005). Embora muito utilizada, essa prática de clorar os efluentes pode gerar compostos mutagênicos incolores, que podem contaminar tanto a água bruta quanto a tratada em casos de captação de águas contendo estes compostos.

Shiozawa et al. (1999) demonstraram que a redução de azo corantes por hidrossulfito de sódio para descoloração dos corantes remanescentes e sucessivas etapas de cloração com ácido hipoclórico podem formar benzotriazóis derivados do 2-fenilbenzotriazol (PBTA) que podem ser até 60 vezes mais mutagênicos que o corante de origem. No meio ambiente aquático, a presença dessas substâncias pode ocorrer, inicialmente através do tratamento do efluente têxtil com hidrossulfito de sódio, utilizado para remoção da cor, gerando os PBTAs não-clorados (non-CIPBTA). Esse efluente, agora sem cor, sendo enviado a uma estação de tratamento de esgoto municipal, que clora seus efluentes antes de liberá-los para os corpos d'água, poderá gerar os PBTAs. Vários PBTAs diferentes já estão descritos na literatura, e suas estruturas químicas variam de acordo com os corantes que os originou (OLIVEIRA, 2005).

Umbuzeiro et al. (2004; 2005b) em um estudo realizado no Ribeirão dos Cristais, região metropolitana de São Paulo, detectaram atividade mutagênica na água tratada fornecida para a população de Cajamar. Essa contaminação foi relacionada à presença de corantes na água bruta, ocasionada pelo lançamento de efluente mutagênico proveniente de uma indústria de tingimento, localizada a 6 Km da captação da Estação

de Tratamento de Água (ETA). Oliveira et al. (2006) detectaram a presença de corantes do tipo azo na água tratada fornecida à população. Além disso, ainda foram detectadas substâncias mutagênicas incolores geradas após a etapa de cloração da água, supostamente semelhante ao 2-fenilbenzotriazol (PBTA).

Portanto, já foi demonstrado que águas brutas contaminadas por corantes não são tratadas de forma eficaz nas ETAs, pois os processos de tratamento convencionais não são capazes de remover totalmente os corantes assim como seus produtos mutagênicos (OLIVEIRA et al., 2006; KUMMROW, UMBUZEIRO, 2008).

Segundo Osugi et al. (2009) soluções aquosas contaminadas com os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 tratadas com o procedimento convencional de cloração mostraram que este método não é eficiente na remoção da mutagenicidade causada pelos corantes, e ainda promove um aumento da atividade mutagênica do corante Disperse Red 13, evidenciada pelo ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* utilizando a linhagem TA98 na presença de sistema exógeno de metabolização.

Recentemente, alguns autores têm apontado que o uso da fotoeletrocatálise em eletrodos finos de Ti/TiO_2, onde o cloro ativo é produzido, promove uma rápida degradação de corantes (ZANONI, SENE, ANDERSON, 2003; CARNEIRO et al., 2004). No entanto, a metodologia tem sido pouco explorada e os produtos gerados por cloração convencional necessitam de avaliação.

1.3.2 Processos Oxidativos Avançados (POAs)

Tendo em vista todos esses inconvenientes nos sistemas tradicionais de tratamento de efluentes, fica fácil entender o porquê do crescimento dos processos oxidativos avançados (POAs) na degradação dos corantes em sistemas aquosos nos últimos anos. Estes processos são baseados na geração de espécies muito reativas, como os radicais hidroxilas (•OH), que oxidam uma variedade de poluentes de maneira rápida e não-seletiva, promovendo a total mineralização desses compostos a CO_2 e água (NOGUEIRA, JARDIM, 1998).

Os POAs dividem-se em sistemas homogêneos e heterogêneos nos quais os radicais hidroxilas são gerados com ou sem irradiação ultravioleta. Dentre os POAs,

a fotocatálise heterogênea tem sido amplamente estudada, principalmente nas últimas duas décadas. Entre as diversas publicações referentes à fotocatálise, uma série de revisões recentes aborda a aplicação do processo à descontaminação ambiental (NOGUEIRA, JARDIM, 1998). Uma breve descrição do princípio do processo será apresentada a seguir.

O princípio da fotocatálise heterogênea envolve a ativação de um semicondutor (geralmente TiO_2) por luz solar ou artificial. Este semicondutor é caracterizado por bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC) sendo a região entre elas chamada de "bandgap" (NOGUEIRA, JARDIM, 1998). Uma representação esquemática da partícula do semicondutor é mostrada na Figura 2.

A absorção de fótons com energia superior à energia de "bandgap" resulta na promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução com geração concomitante de uma lacuna (h^+) na banda de valência. Estas lacunas mostram potenciais bastante positivos, na faixa de +2,0 a +3,5 V medidos contra um eletrodo de calomelano saturado, dependendo do semicondutor e do pH. Este potencial é suficientemente positivo para gerar radicais hidroxilas (•OH) a partir de moléculas de água adsorvidas na superfície do semicondutor, os quais podem subseqüentemente oxidar o contaminante orgânico. A eficiência da fotocatálise depende da competição entre o processo em que o elétron é retirado da superfície do semicondutor e o processo de recombinação do par elétron/lacuna (e^-/h^+) o qual resulta na liberação de calor (NOGUEIRA, JARDIM, 1998).

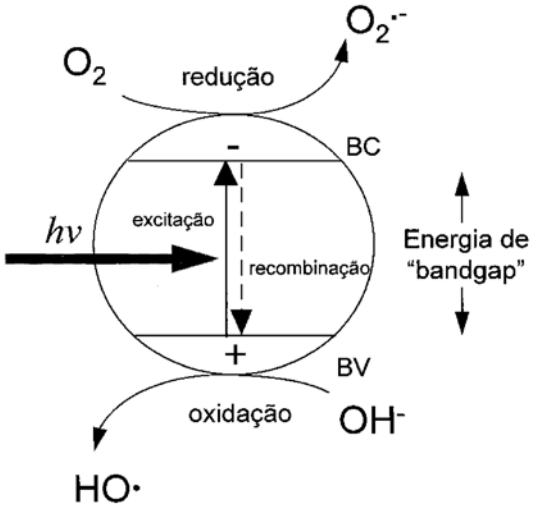


FIGURA 2. Esquema representativo da partícula de um semicondutor, onde BV é a banda de valência, BC é a banda de condução, *hv* é a energia aplicada. Fonte: NOGUEIRA, JARDIM (1998) modificado.

A vantagem-chave desse processo é sua natureza destrutiva inerente: não envolve transferência de massa, pode ser executado sob condições ambientais (oxigênio atmosférico é usado como oxidante), pode conduzir à completa mineralização do carbono orgânico em CO_2 e H_2O, não requer a adição de produtos químicos e não há geração de lodo, além de promover a despoluição em curto espaço de tempo. Além disso, TiO_2 é largamente disponível, barato, absorve radiação UV em comprimentos de onda < 380 nm, tem potencial redox da banda de valência adequado para catalisar diversas reações, é resistente à corrosão em ampla faixa de pH, não-tóxico e mostra alta estabilidade química (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004).

Uma estratégia para aumentar a eficiência da fotocatálise é a fotoeletrocatálise, que consiste da aplicação de um potencial elétrico constante no fotoanodo, que retarda a recombinação de cargas nas partículas do semicondutor e tem sido usada com sucesso para a degradação de poluentes orgânicos (ZANONI, SENE, ANDERSON, 2003; CARNEIRO et al., 2004; OSUGI et al., 2006; OSUGI et al., 2009).

Fotoeletrocatálise usando TiO_2 como fotocatalisador

A oxidação fotoeletrocatalítica é a combinação das tecnologias eletroquímicas e fotoquímicas (OSUGI et al., 2005) e apresenta vantagem sobre a fotocatálise por aplicar um potencial através de um fotoeletrodo no qual o catalisador está apoiado. Essa configuração permite a separação mais efetiva das cargas geradas neste processo, aumentando assim, o tempo de vida dos pares elétrons-lacunas (e^-/h^+). Apesar dessa vantagem, poucos estudos têm sido conduzidos na aplicação dessa nova tecnologia para a degradação dos corantes têxteis (ZANONI, SENE, ANDERSON, 2003; OSUGI et al., 2005).

A técnica de fotoeletrocatálise consiste no uso de um fotocatalisador (eletrodo de trabalho). Neste caso a superfície de titânio (Ti) recoberta com dióxido de titânio (TiO_2) é ativada sob iluminação ultravioleta (hv), e separados pela aplicação de um potencial positivo (Eapp) maior que o potencial de banda plana do semicondutor. A eficiência do processo fotocatalítico é aumentada, pois sob gradiente de potencial, os elétrons são redirecionados para o eletrodo (cátodo), retardando a recombinação entre lacunas (h^+) geradas na banda de valência (BV) e elétrons (e^-) gerados na banda de condução (BC) do semicondutor (Figura 3) (OSUGI et al., 2006).

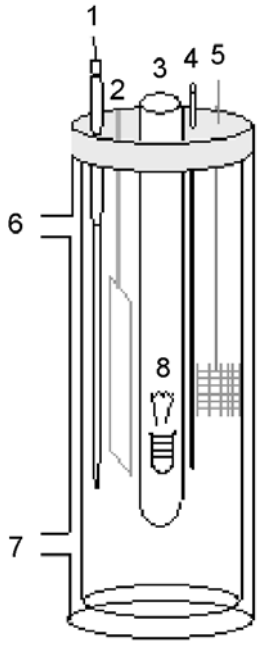


FIGURA 3. Representação esquemática do reator fotoeletrocatalítico contendo: (1) eletrodo de referência; (2) eletrodo de trabalho (fotoanodo de Ti/TiO_2); (3) bulbo de quartzo; (4) ar comprimido; (5) contra-eletrodo (rede de platina); (6) e (7) circulação de água; (8) Lâmpada germicida de 125 W Philips, operando como fonte de luz UV (315-400 nm). Fonte: Paschoal et al. (2008) modificado.

A potencialidade da técnica de fotoeletrocatálise na oxidação fotoeletrocatalítica de corantes da família azo tem sido investigada pelo grupo de eletroanalítica da UNESP de Araraquara com resultados bastante promissores. Um exemplo disso, é o trabalho desenvolvido por Osugi et al. (2009), em que após uma hora de oxidação fotoeletrocatalítica, todas soluções aquosas contaminadas com os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 (corantes estudados neste trabalho) mostraram completa redução da atividade mutagênica obtida em um ensaio preliminar com *Salmonella typhimurium* utilizando a linhagem TA98 na ausência e na presença de S9 (sistema exógeno de metabolização), sugerindo que este processo deve ser eficiente na remoção de azo corantes de meio aquoso, bem como de seu efeito mutagênico.

1.4 Teste de Micronúcleos em Células $HepG_2$

1.4.1 Mutações

Mutação é uma alteração na seqüência de DNA de um gene e, portanto é a principal fonte de mudança evolutiva. Os genes e os cromossomos podem sofrer mutações ou no tecido somático ou no germinativo, e estas alterações são chamadas de mutações somáticas e mutações germinativas, respectivamente. As mutações somáticas não são transmitidas à prole, mas as mutações germinativas podem ser transmitidas a parte da prole ou a toda ela (GRIFFITHS et al., 1998).

As mutações em geral surgem pela ação de alguns agentes, chamados mutágenos, que aumentam a taxa na qual ocorrem as mutações. Assim, surgem novos alelos em todos os organismos, alguns espontaneamente, outros como resultado da exposição à radiação ou substâncias químicas no meio ambiente. As mutações espontâneas são muito menos freqüentes do que as mutações induzidas, mas são evolutivamente mais importantes (GRIFFITHS et al., 2006).

O termo mutação refere-se a um amplo espectro de tipos diferentes de mudanças. Existem as alterações mutacionais que afetam cromossomos inteiros ou grandes pedaços de cromossomos e os eventos mutacionais que ocorrem dentro de genes individuais (GRIFFITHS et al., 2006). Portanto, a mutação pode ocorrer em dois níveis diferentes, são eles:

- Mutação gênica: um alelo de um gene muda, tornando-se um alelo diferente. Como tal alteração ocorre dentro de um único gene e está em um lócus cromossômico (“ponto”), a mutação gênica às vezes é chamada de mutação de ponto (GRIFFITHS et al., 1998). Existem duas classes gerais de mutação gênica: as mutações que afetam pares de bases únicos no DNA e as mutações que alteram o número de cópias de uma pequena seqüência de repetição dentro de um gene (GRIFFITHS et al., 2006).
- Mutação cromossômica: segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros, ou mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram. Os efeitos de uma mutação cromossômica se devem a novos arranjos de cromossomos e dos genes que eles contêm. Entretanto, algumas

mutações cromossômicas, em particular as que se originam de quebras cromossômicas, são acompanhadas de mutações gênicas no ponto de quebra (GRIFFITHS et al., 1998; GRIFFITHS et al., 2006).

Dentro destas duas amplas categorias, existem vários tipos de mutações, incluindo morfológicas, letais, condicionais, bioquímicas e mutações de resistência (GRIFFITHS et al., 1998).

Neste trabalho, será dada maior ênfase às mutações cromossômicas, pois são essas as detectadas pelo ensaio de micronúcleo.

Mutação Cromossômica

A mutação cromossômica é o processo de mudança que resulta em partes rearranjadas do cromossomo, números anormais de cromossomos individuais, ou números anormais de conjuntos cromossômicos. Este tipo de alteração mutacional é importante sob vários aspectos biológicos (GRIFFITHS et al., 2006):

- ✓ Pode ser uma fonte de compreensão de como os genes atuam em conjunto em uma escala genômica.
- ✓ Revela características importantes da meiose e arquitetura cromossômica.
- ✓ É um instrumento útil para a manipulação genômica experimental.
- ✓ Pode ser usada para compreender os processos evolutivos.

Muitas mutações cromossômicas causam anomalias na célula e no funcionamento do organismo. Estas anomalias são resultantes de mudanças no número ou na posição dos genes, e em alguns casos, de uma quebra cromossômica (GRIFFITHS et al., 2006).

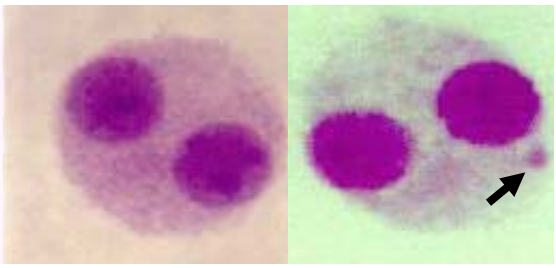
Sendo assim, as mutações cromossômicas podem ser divididas em dois grupos: mudanças no número de cromossomos e mudança na estrutura do cromossomo. Estes dois grupos representam dois tipos fundamentalmente diferentes de eventos. As mudanças no número de cromossomos não estão associadas a alterações estruturais de qualquer das moléculas de DNA da célula. Ao contrário, é o número dessas moléculas de DNA que é alterado, e esta mudança no número é a base de seus efeitos genéticos (GRIFFITHS et al., 2006).

As mudanças na estrutura do cromossomo, por outro lado, resultam em uma nova seqüência de arranjos dentro de uma ou mais dupla hélices de DNA (GRIFFITHS et al., 2006). Estas podem ser classificadas em:

- Deleção ou deficiência: ocorre a perda simples de um segmento cromossômico;
- Duplicação: ocorre a presença de duas cópias de uma região cromossômica;
- Inversão: um segmento de um cromossomo pode girar 180 graus e se reunir ao cromossomo;
- Translocação: é produzida quando dois cromossomos não-homólogos trocam partes (GRIFFITHS et al., 1998).

1.4.2 Micronúcleos (MNs)

O micronúcleo (MN) (Figura 4) é definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante o processo de divisão celular, quando, na telófase, o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células-filhas (SALVADORI, RIBEIRO, FENECH, 2003).



(A) **(B)**

FIGURA 4. Células binucleadas (BN) com bloqueio de citocinese sem MN (A) e com MN, marcado com seta (B).
Fonte: <http://www.igcar.ernet.in/igc2004/sg/micronu.jpg> Acesso em: 10 de junho de 2009.

Eles são constituídos por fragmentos cromossômicos acêntricos, que não foram incorporados no interior do núcleo das células-filhas (efeito clastogênico) ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) e, por isso, foram excluídos do núcleo principal das células-filhas (CAMPANA et al., 1999).

Os cromossomos inteiros presentes nos MNs são primeiramente oriundos da falha no fuso mitótico, cinetócoro, ou outra parte do aparato mitótico, ou por dano nas subestruturas cromossômicas, nas alterações de fisiologia celular ou de mecanismo desregulado. Assim, um aumento da freqüência de células micronucleadas é um biomarcador de efeitos mutagênicos, que podem refletir exposição a agentes clastogênicos ou modos de ação aneugênicos (ALBERTINI et al., 2000).

Desta forma, a detecção de micronúcleos representa perda de cromatina em conseqüência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico sendo considerados como mutações que são transmitidas, pois o dano genético se manifesta nas células-filhas (SALVADORI, RIBEIRO, FENECH, 2003). É importante ressaltar que os MNs são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos causados no DNA, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MNs após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da freqüência de MNs entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH, 1997).

Para a realização do teste de micronúcleo, podem ser empregados diferentes tipos de células, como as vegetais, humanas e de outros mamíferos, desde que sejam células capazes de se dividir ou que seja possível induzir a divisão, e que este processo seja conhecido e passível de controle (FENECH, 2000). Neste trabalho foram utilizadas células $HepG_2$ que serão discutidas mais adiante.

1.4.2.1 Teste de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN)

No teste de micronúcleos *in vitro,* é importante a utilização de citocalasina-B, um inibidor da polimerização da proteína actina, requerida para a formação de anel

de microfilamentos, que induz à contração do citoplasma e divisão da célula em duas células-filhas (citocinese) (FENECH, CROTT, 2002; SALVADORI, RIBEIRO, FENECH, 2003). Essa substância leva à inibição da citocinese, mas não impede o processo de divisão nuclear. Como resultado, observa-se um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão celular (FENECH, 2000; SALVADORI, RIBEIRO, FENECH, 2003).

A análise em células binucleadas permite não somente a comparação da freqüência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir em sua cinética de divisão, mas também uma medida mais precisa da freqüência de células micronucleadas, considerando que seria necessário avaliar o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos observados em células binucleadas (FENECH, 1997; SALVADORI, RIBEIRO, FENECH, 2003).

Assim, a técnica de bloqueio da citocinese utilizando a citocalasina-B, permite o reconhecimento das células por suas aparências binucleadas (FENECH et al., 1999), como mostra a Figura 5.

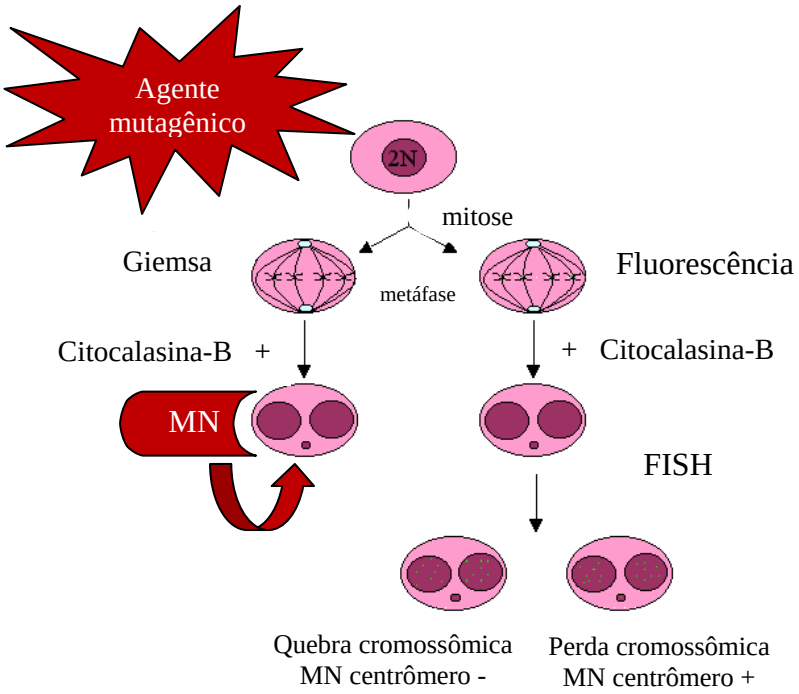


FIGURA 5: A expressão do micronúcleo em uma célula em divisão, durante a exposição ao um agente mutagênico.
Fonte:<http://we.vub.ac.be/~cege/volders/ENG/tests/mn_schema.gif> Acesso em: 10 de junho de 2009.

O ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) pode ser utilizado para o monitoramento de populações expostas a substâncias mutagênicas e para avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos (BONASSI et al., 2003; SALVADORI, RIBEIRO, FENECH, 2003).

Já foi mencionado que os micronúcleos são originados do revestimento de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos acêntricos e estes eventos somente podem ser observados em células com divisão nuclear completa, as quais são reconhecidas pela sua aparência binucleada após o bloqueio da citocinese pela citocalasina-B (FENECH, 2007). Desta forma, a maioria dos ensaios de micronúcleos utiliza o bloqueio da citocinese.

1.4.2.2 Critérios estabelecidos para realizar o teste de micronúcleos (FENECH, NEVILLE, RINALDI, 1993; FENECH et al., 2003)

As células com citocinese bloqueada que podem ser marcadas pela freqüência de micronúcleos devem apresentar as seguintes características:

- As células devem ser binucleadas;
- Os dois núcleos em uma célula binucleada (BN) devem ter membranas nucleares intactas e devem estar situados dentro do mesmo limite citoplasmático;
- Os dois núcleos em uma célula BN devem ser aproximadamente iguais no tamanho, na intensidade e no molde da coloração;
- Os dois núcleos dentro da célula podem estar unidos por uma fina ponte nucleoplasmática, cuja largura não pode ser superior a um quarto do diâmetro do maior núcleo;
- Os dois núcleos principais em uma célula BN podem tocar-se, mas o ideal seria não sobreporem-se. Uma célula com dois núcleos sobrepostos pode ser marcada somente se os limites de cada núcleo forem distinguíveis;
- O limite citoplasmático ou membrana de uma célula BN deve ser intacta e claramente distinguível do limite citoplasmático de células adjacentes.

1.4.2.3 Critérios para o reconhecimento de micronúcleos (FENECH et al., 2003).

Os MNs são morfologicamente idênticos, mas menores que o núcleo principal. Eles apresentam as seguintes características:

- O diâmetro entre 1/16 até, no máximo, 1/3, dos núcleos principais (ou entre 1/256 a 1/9 da área de um dos núcleos principais);
- MNs apresentam formato redondo ou oval;
- MNs não são refráteis;
- MNs não estão ligados ou conectados ao núcleo principal;
- MNs podem tocar, mas não podem sobrepor o núcleo principal e o limite micronuclear deve ser distinguível do limite nuclear;
- MN geralmente tem a mesma intensidade de cor do núcleo principal.

1.4.3 Células HepG$_2$

As células HepG$_2$ foram isoladas em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino de 11 anos. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998). Essas células conservam as atividades das enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, bem como as enzimas de fase II, incluindo glutationa-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuranosiltransferases, sendo que tais enzimas estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, e apresentam importante função na ativação e destoxificação de substâncias que reagem com o DNA (UHL, HELMA, KNASMÜLLER, 1999; MAJER et al., 2004; LAMY et al, 2004; CHEQUER et al., 2009). Portanto, é aceitável que os ensaios com células HepG$_2$ reflitam mais adequadamente os danos causados por mutágenos que os testes *in vitro* feitos com bactérias ou células de mamíferos, tais como a CHO

(linhagem celular derivada do ovário de hamster chinês), SHE (célula de embrião de hamster sírio) ou V79 (linhagem celular derivada de fibroblastos de pulmão), que requerem a adição de sistemas de metabolização exógenos para mimetizar o metabolismo de compostos de ação indireta (UHL, HELMA, KNASMÜLLER, 2000; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; MAJER et al., 2004, LAMY et al., 2004).

O tempo de geração das células $HepG_2$ é substancialmente mais longo (20 a 28 horas) quando comparado com linhagens celulares de roedores (V9, CHO), que são atualmente usadas em toxicologia genética (UHL, HELMA, KNASMÜLLER, 1999; MAJER et al., 2004).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista todo o potencial de dano ao material genético de diferentes sistemas celulares provocados tanto pelos corantes originais quanto pelos seus produtos de biotransformação e degradação, e a dificuldade de removê-los dos efluentes industriais pelo método de lodo ativado, assim como a ineficiência da cloração na remoção destes compostos na produção de água tratada e geração de compostos incolores desconhecidos, este trabalho propõe avaliar a eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise na remoção da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 presentes em amostras aquosas em comparação à cloração química convencional.

Para atingir este objetivo geral, os objetivos específicos foram:

- Avaliar a mutagenicidade dos corantes após o tratamento por cloração química convencional, utilizando o ensaio de micronúcleo em células $HepG_2$;
- Avaliar a mutagenicidade dos produtos gerados após a fotoeletrocatálise utilizando o mesmo ensaio;
- Comparar os resultados da fotoeletrocatálise com o tratamento convencional de amostras aquosas por cloração, bem como com os resultados obtidos com a mutagenicidade original dos corantes já estudados por nosso grupo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Soluções utilizadas

- **Meio de Cultura:**

Foram dissolvidos 9,61g de *Minimum Essential Médium* (MEM - Gibco) em cerca de 500mL de água MilliQ. Foram acrescentados 2,2g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), 10mL da solução de antibiótico-antimicótico (Sigma) e 10mL de piruvato de sódio (Sigma) sendo completado o volume para 1L com água MilliQ. O meio foi mantido sob agitação por 10 minutos para a completa dissolução, o pH foi corrigido para 7,2 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a 0,1 M, mas em caso de necessidade foi utilizado concentrações maiores ou menores. A esterilização foi realizada por filtração em membrana 0,22µm. O meio foi armazenado em frasco estéril em geladeira.

- **Meio de Cultivo: solução de uso**

Como os meios de cultivo não contêm substâncias mitogênicas, foi necessária a adição de estimulantes de divisão, tais como o fator de crescimento presente no soro bovino fetal (SBF). Por este motivo, antes de iniciar o uso na cultura de células $HepG_2$, o SBF foi adicionado numa proporção de 10% do volume total de meio preparado.

- **PBS**

Em balão volumétrico, foram dissolvidos 0,2g de cloreto de potássio (KCl), 0,2g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 8,0g de cloreto de sódio (NaCl), 1,15g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4) em água deionizada q.s.p. 1000mL, sendo agitados até a completa solubilização. Foi corrigido o pH para 7,4 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a usualmente 0,1M, 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%**

A tripsina é uma enzima proteolítica, que foi utilizada para o desprendimento das células $HepG_2$ do frasco, através da degradação da matriz glicoproteíca extracelular. Para prepará-la, foram adicionados 90 mL de PBS estéril e 10 mL de solução tripsina-EDTA (Sigma) em um frasco de 100mL esterelizado. Homogeneizou-se e armazenou-se em geladeira.

- **Citocalasina-B solução-mãe (2mg/mL)**

A citocalasina é um inibidor da actina, que age no final da divisão celular impedindo a citocinese. Para prepará-la, foram adicionados 2,5mL de DMSO estéril ao frasco de 5mg de citocalasina-B (Sigma). Homogeneizou-se e foi armazenada na geladeira.

- **Citocalasina-B solução de uso (300µg/mL)**

Foram adicionados 300µL da solução mãe de citocalasina B (2mg/mL) em 1,7 mL de PBS contidos em frasco de congelamento. Em seguida, o frasco foi coberto com papel alumínio, para evitar a degradação, uma vez que a citocalasina B mostra-se fotossensível. Essa solução foi armazenada em congelador.

- **Solução hipotônica de Citrato de Sódio**

A solução de citrato de sódio, $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$, foi preparada em água deionizada a 0,1%, no dia anterior ao seu uso. A solução foi conservada em geladeira, pois precisava estar gelada para ser utilizada.

- **Fixador Metanol - Ácido Acético 3:1**

Em uma proveta de 50mL, foram misturados 30mL de metanol e 10mL de ácido acético glacial. Quando foi necessário preparar volumes maiores, essa proporção 3:1 foi mantida. O fixador foi sempre preparado no momento do uso, para que o mesmo não perdesse a sua ação.

- **Tampão Fosfato**

Em um balão volumétrico, foram dissolvidos 5,26 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 0,06M) e 8,65 g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4 0,06M) em água deionizada, em quantidades suficientes para 1000mL. Agitou-se até a completa dissolução e o pH foi corrigido para 6,8 utilizando hidróxido de sódio ou ácido clorídrido a usualmente 0,1M, mas em caso de necessidade foram utilizadas concentrações maiores ou menores. A solução foi conservada em geladeira. Este tampão foi utilizado na coloração das lâminas com Giemsa.

- **Solução Giemsa**

Em um frasco âmbar, 3g de Giemsa foram misturados em 162mL de glicerina e essa mistura foi colocada, em banho-maria, a 60°C *overnight*. Posteriormente, foram adicionados 252mL de metanol e homogeneizou-se. Após o período de um mês, a solução foi filtrada e armazenada em frasco âmbar. A solução Giemsa foi utilizada para corar as células fixadas nas lâminas, em uma proporção de 1:30 com tampão fosfato.

3.1.2 Corantes estudados

Conforme já citado, neste trabalho foram avaliados os produtos gerados pela cloração e fotoeletetrocatálise dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1, Disperse Red 13 presentes em amostras aquosas. A estrutura química de cada corante está mostrada na Figura 6.

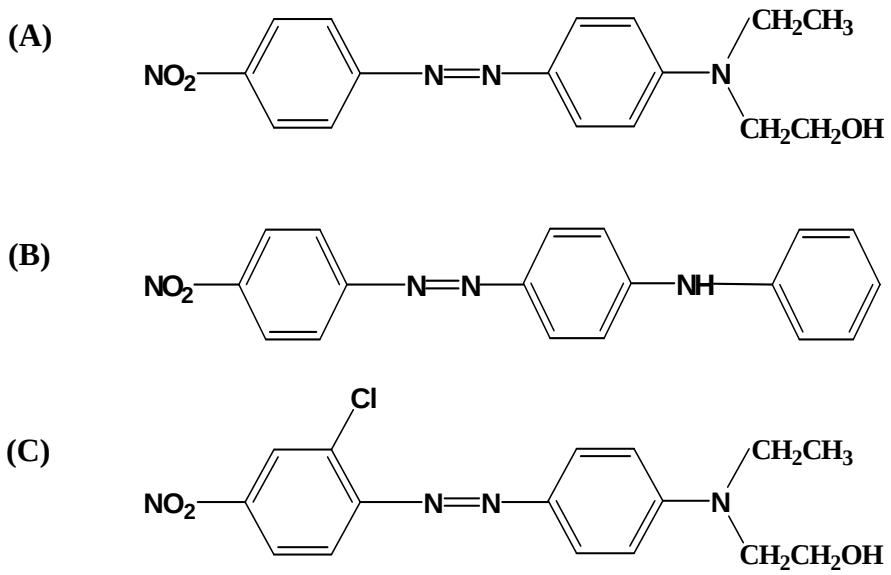


FIGURA 6. Estrutura química dos azo corantes (A) Disperse Red 1, (B) Disperse Orange 1, (C) Disperse Red 13

As soluções estoques dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 nas concentrações 1,0 mg/mL, 4,0 mg/mL e 10,0 mg/mL, respectivamente, foram cloradas e fotoeletrocatalisadas.

A técnica de fotoeletrocatálise foi recentemente desenvolvida pelo grupo da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), em Araraquara. As técnicas de fotoeletrocatálise e cloração química analisadas neste trabalho foram realizadas em colaboração com o grupo de química analítica da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni (UNESP).

3.2 Métodos

3.2.1 Teste de Micronúcleos em Células $HepG_2$

3.2.1.1 Protocolo para cultivo e manutenção da cultura das células $HepG_2$

Descongelamento das células $HepG_2$

- Primeiramente, as células foram removidas do nitrogênio líquido;
- As células foram descongeladas e, rapidamente foram transferidas para um tubo cônico estéril com 9,0mL de meio de cultivo;
- As células foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos em 1500rpm;
- O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspendido com 1,0mL de meio de cultivo;
- As células foram homogeneizadas e transferidas para um frasco de cultura de $75cm^2$ contendo 14,0mL de meio de cultivo;
- Este frasco de cultura foi colocado na estufa à 37°C com 5% de CO_2.

Repique e Manutenção das células $HepG_2$ para o Teste de Micronúcelos

- O meio de cultivo foi descartado;
- As células foram lavadas com 10,0mL de PBS, a fim de remover totalmente o meio de cultivo que estava no frasco;
- O excesso de PBS foi removido com pipeta de Pasteur;
- Foram adicionados 5,0mL de tripsina;
- Homogeneizou-se, e o frasco foi colocado deitado na estufa, para que a tripsina entrasse em contato com toda a superfície celular, por 3 minutos;
- Após os 3 minutos, foram dadas algumas batidas no frasco de cultura, para que houvesse o desprendimento das células, que estavam na superfície do mesmo;
- A tripsina foi inativada com 5,0mL de meio de cultivo;
- O volume total do frasco de cultura foi transferido para um tubo cônico estéril de 15,0mL e este foi centrifugado por 5 minutos a 1000rpm;
- O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspendido com 1,0mL de meio de cultivo;
- Este volume de suspensão foi divido para dois frascos de cultura de $75cm^2$ com 14,0 mL de meio de cultivo em cada, e colocados em estufa a 37°C com 5% de CO_2, para fazer a manutenção das células.
- Para iniciar o teste de micronúcleos, foi necessário fazer a contagem das células em câmara de Newbauer.

3.2.1.2 Protocolo para realizar o ensaio de micronúcleos em cultura de células $HepG_2$ (realizado de acordo com o protocolo de Natarajan, Darroudi, [1991], com algumas modificações)

- Inicialmente a câmara de Newbauer foi preenchida com a suspensão celular, para saber o total de células presentes na cultura e qual o volume de suspensão celular necessário para cultivar $5,0 \times 10^5$ células $HepG_2$ em frascos de cultura de $25cm^2$;
- Após a contagem, adicionou-se o volume de suspensão celular correspondente a $5,0 \times 10^5$ células nos frascos de cultura de $25cm^2$ com 5,0mL de

meio de cultivo. Estes foram fechados e colocados na estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas;

- Após 24 horas, foi feito o tratamento das culturas. No frasco correspondente ao controle positivo, foram colocados 12,0µL de benzopireno à 31,25mg/mL, de forma que a concentração final no meio fosse de 75,0µg/mL; No frasco correspondente ao controle negativo foram colocados 50,0µL de PBS e nos frascos correspondentes aos corantes foram colocadas as soluções desses compostos tratadas por cloração ou fotoeletrocatálise, de forma que as concentrações finais testadas fossem de 0,1; 0,2; 0,4; 1,0 e 2,0 µg/mL para o corante Disperse Red 13 e 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 4,0 µg/mL para os corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1. Após o tratamento, todos os frascos foram novamente incubados a 37°C com 5% de CO_2 por mais 20 horas em estufa;
- Após as 44 horas, o meio de cultivo de cada frasco foi desprezado, e foi adicionado 5,0mL de PBS a 37°C para lavar as células. Em seguida, o PBS foi descartado e, então foram colocados 5,0mL de meio de cultivo em cada frasco. Após isso, foram adicionados 50µL da solução de citocalasina B de uso, de forma que a concentração final no meio fosse de 3,0µg/mL. Os frascos foram colocados na estufa a 37°C com 5% de CO_2 por mais 28 horas;
- Ao término das 72 horas procedeu-se a colheita e o teste de viabilidade celular, conforme descritos a seguir.

Colheita para o Ensaio de Micronúcleos em células $HepG_2$

- Os meios de cultivo de cada frasco foram retirados e colocados nos respectivos tubos de centrífuga cônicos identificados;
- Os frascos foram lavados duas vezes com 5,0mL de PBS. A primeira lavagem foi reservada no tubo de centrífuga, já a segunda lavagem foi descartada. Retirou-se o excesso de PBS de cada frasco com pipeta de Pasteur;
- Em cada frasco foram adicionados 0,5 mL de tripsina 0,1% e os frascos foram colocados na estufa por 5 minutos;
- Foram dadas algumas batidas em todos os frascos de cultura, para desprender as células da superfície;
- A tripsina foi inativada com o meio reservado no tubo de centrífuga. Depois, utilizando uma pipeta Pasteur, o meio foi homogeneizado e devolvido para os respectivos tubos de centrífuga;

- Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000rpm;
- O sobrenadante foi retirado até restar 1,5mL e foram adicionados 5,0mL de solução de citrato gelada. Todos os tubos foram homogeneizados durante 5 minutos;
- Em cada frasco foram adicionados 20,0µL de formaldeído, e homogeneizou-se imediatamente;
- Novamente os frascos foram centrifugados a 1000rpm por 5 minutos;
- O sobrenadante foi retirado até restar 1,5mL e foram adicionados 5,0mL de fixador metanol/ácido acético, homogeneizando cada frasco imediatamente;
- Em seguida, foi feita uma centrifugação por 5 minutos a 1000rpm;
- O fixador de cada frasco foi removido utilizando pipeta Pasteur, deixando a quantidade suficiente para a confecção das lâminas.

Preparo das lâminas para análise de micronúcleo

- Ambos os lados das lâminas foram lavadas com bucha e extran. Depois, foram bem enxaguadas em água corrente e posteriormente em água destilada. Este procedimento foi repetido até que se observou a formação de um filme d'água sobre a lâmina. Após a formação do filme, as lâminas foram acondicionadas em fracos de vidro, devidamente limpos, mergulhadas em água destilada. Este frasco com as lâminas foi colocado na geladeira. Tanto a lavagem como a refrigeração das lâminas foram realizadas um dia antes da colheita;
- Em cada lâmina foram colocadas 2 gotas da suspensão de células. Após a total secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa em tampão fosfato na proporção de 1:30 por 5 a 7 minutos.

3.2.2 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 violácea, 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). Nosso grupo utilizou o ensaio com MTT para avaliar a viabilidade celular dos corantes originais Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13, entretanto devido à forte coloração desses corantes, ocorreu interferência na análise espectrofotométrica, inviabilizando a leitura (dados não mostrados). Por isso, o ensaio de exclusão pelo trypan blue foi utilizado (CHEQUER, 2008; CHEQUER et al., 2009). Dessa forma, a viabilidade celular dos mesmos corantes após cloração e fotoeletrocatálise foi também avaliada utilizando o ensaio de exclusão pelo trypan blue, para permitir comparação com os corantes originais.

3.2.2.1 Teste de viabilidade celular pela Técnica 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).

Protocolo do Teste de exclusão do corante *trypan blue*

Foi feito uma diluição 1:1, ou seja, foram colocados 20µL da suspensão de células tratadas com as soluções cloradas e fotoeletrocatalisadas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 em microtubos e foram adicionados 20µL da solução de trypan blue a 0,25% em PBS, sendo estes homogeneizados. Uma câmara de Newbauer foi preenchida com estas soluções para realizar a contagem de células viáveis e não viáveis. Foram avaliadas 100 células em microscópico de luz e foi determinada a porcentagem de células viáveis.

3.2.3 Análise Estatística

Foram realizadas três repetições do ensaio de micronúcleos em células HepG2 tratadas com os corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração e fotoeletrocatálise, que serão apresentadas no item Resultados e Discussão. Sendo assim, foram feitas as análises estatísticas das três repetições por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett (α=0,05), com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da concentração empregada como controle positivo

O benzopireno (B(a)P) é um hidrocarboneto aromático policíclico, classificado como um forte mutágeno e carcinógeno humano (LAMY et al., 2004; LAMY et al., 2008; BANNI et al., 2009), e está distribuído no ambiente (LAMY et al., 2004; LAMY et al., 2008). Para exercer seus efeitos genotóxicos e/ou carcinogênicos, o B(a)P tem que ser ativado pelas monooxigenases do citocromo P-450 (CYP-450), a uma variedade de eletrófilos que podem se ligar covalentemente ao DNA, RNA ou às proteínas (LAMY et al., 2008). O principal metabólito do B(a)P responsável por suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas é o 7,8-dihidroxi-9,10-epóxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzopireno (BPDE) que reage com os sítios nucleofílicos das bases do DNA (JOLLES et al., 1987).

Dessa forma, o B(a)P foi escolhido para ser usado como controle positivo neste experimento, pela sua característica de exercer efeito mutagênico após a biotransformação. Isto torna possível avaliar a atividade de biotransformação das células $HepG_2$, porque como já mencionado anteriormente, esta é uma linhagem celular que conserva as atividades das enzimas de fase I e II, envolvidas no metabolismo de xenobióticos, promovendo a ativação ou destoxificação desses compostos.

Inicialmente, foi feito o experimento preliminar para a escolha da melhor concentração de B(a)P para ser utilizada como controle positivo. Foram testadas as concentrações 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 µg/mL. Essas concentrações foram escolhidas baseando-se em concentrações de B(a)P capazes de induzir a formação de micronúcleos em três sub-clones de células $HepG_2$, de acordo com Majer et al. (2004).

Segundo Fenech (2000), para a análise de micronúcleo, as culturas devem apresentar um percentual de células binucleadas (BN) acima de 35%. Portanto esse foi um dos critérios para a escolha da concentração de 75,0 µg/mL de B(a)P como controle positivo, uma vez que apresentou a porcentagem de células BN acima desse valor, como pode ser verificado na Tabela 1.

Para melhor avaliar o potencial citotóxico do B(a)P foi calculado o IPBC, índice de proliferação de bloqueio da citocinese. Este índice é calculado baseando-se no número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas encontradas no total de 500 células contadas por tratamento. Sendo assim, uma queda no valor do IPBC indica perda de funções celulares e/ou morte celular. O cálculo é feito de acordo com a expressão:

$$IPBC = \frac{[M1 + 2(M2) + 3(M3+M4)]}{N}$$

Onde M1-M4 representam os números de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos respectivamente, e N é o número total de células contadas. O IPBC foi calculado para cada tratamento de acordo com Lorge et al. (2008).

Assim, de acordo com a Tabela 1 e a Figura 7, a concentração de 75,0 µg/mL foi escolhida como controle positivo, primeiramente, por induzir a formação de maior número de micronúcleos (média = 42 MN) em relação às demais concentrações e ao controle negativo e, também por apresentar porcentagem de células binucleadas acima de 35%, sem, contudo, levar à morte celular expressiva, já que esta concentração apresentou o valor de IPBC semelhante ao controle negativo (Figura 8). Este experimento foi realizado em duplicata, sendo que na segunda repetição houve a confirmação do resultado para a concentração de 75,0 µg/mL de B(a)P. Os dados das duas replicatas estão apresentados no Apêndice A.

Na maior dose testada, 100,0 µg/mL, provavelmente houve morte celular, já que durante leitura das lâminas desta concentração pôde-se perceber que o número de células diminuiu, o que sugere toxicidade celular, ainda que o IPBC esteja normal. Além disso, na maior concentração, o número de MN reduziu, o que também indica toxicidade.

TABELA 1. Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleos, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações de benzopireno (B[a]P) (n=2).

B(a)P (µg/mL)	MN[a] (média ± DP)	% BN (média ± DP)	IPBC (média ± DP)
0,0	15,5 ± 0,71	42,9 ± 8,06	1,667 ± 0,13
25,0	13,0 ± 3,53	48,5 ± 10,04	1,722 ± 0,02
50,0	19,0 ± 1,41	49,0 ± 1,41	1,604 ± 0,02
75,0	50,0 ± 15,56*	47,0 ± 2,54	1,556 ± 0,02
100,0	18,5 ± 9,19	49,3 ± 4,67	1,710 ± 0,05

[a] 1000 BN foram analisadas por cultura
* Estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05)

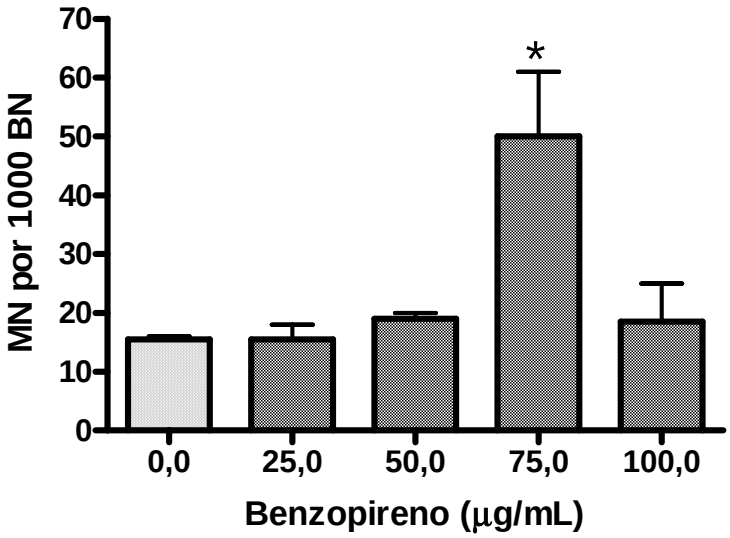


FIGURA 7. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações de benzopireno. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=2).
* Estatisticamente diferente do controle negativo (p<0,05)

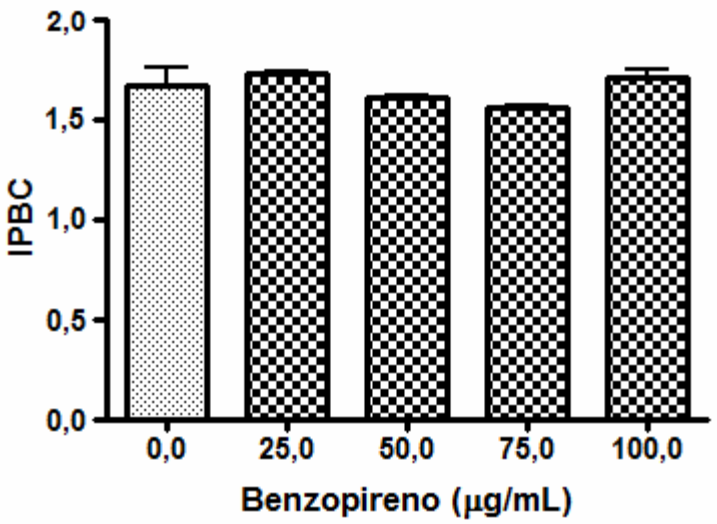


FIGURA 8. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações de benzopireno. Em cada experimento foram analisadas 500 células (n=2).

4.2 Determinação das concentrações dos corantes a serem estudadas

Inicialmente soluções dos corantes foram cloradas em condições similares a uma ETA, em concentrações de 1,0 mg/mL, 4,0 mg/mL e 10,0 mg/mL para os corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, respectivamente. A partir destas soluções cloradas foram realizadas diluições sucessivas em PBS para obter as seguintes concentrações dos corantes clorados Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13: 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL, como mostra as Tabelas 2 e 3. Estas concentrações foram escolhidas baseadas no trabalho desenvolvido, anteriormente pelo nosso grupo com os mesmos corantes originais (0,2; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/mL) (CHEQUER, 2008; CHEQUER et al., 2009).

Como pode ser observado na Figura 9, foi necessário o ajuste de concentração somente para a solução do corante Disperse Red 13 clorado, visto que, a menor concentração deste corante (0,2 µg/mL) induz a formação do maior número de micronúcleos quando comparada com as demais concentrações. Portanto, para melhor avaliar o comportamento do corante Disperse Red 13 após cloração, adicionou-se uma concentração menor (0,1 µg/mL) e exclui-se a maior concentração (4,0 µg/mL).

Observa-se na Tabela 2 que para cada solução clorada existe uma concentração que induz um maior número de micronúcleos e que, após esta concentração, o número de micronúcleos tende a diminuir. Este fato deve-se, provavelmente, à citotoxicidade dos corantes, que causa a morte celular ou a redução da divisão celular e, consequentemente, não há a formação de micronúcleos. Além disso, da mesma forma como foi observado no ensaio com B(a)P, nas maiores concentrações dos corantes, a quantidade de células na lâmina era menor que nas demais doses, ainda que o IPBC estivesse normal (Figura 10). Dessa forma, as concentrações escolhidas para avaliar a mutagenicidade dos corantes clorados foram: Disperse Red 13: 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 µg/mL; Disperse Red 1 e Disperse Orange 1: 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 µg/mL.

TABELA 2. Resultados obtidos em experimentos preliminares para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações das soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração.

Tratamentos (µg/mL)	MN[a]	% BN	IPBC
Controle negativo	14	40,8	1,500
B(a)P 75	61	48,8	1,568
Disperse Red 1			
0,2	16	44,2	1,578
0,4	29	49,8	1,578
1,0	19	50,2	1,544
2,0	07	46,4	1,576
4,0	12	52,6	1,558
Disperse Orange 1			
0,2	09	45,6	1,560
0,4	08	44,8	1,502
1,0	14	46,6	1,510
2,0	11	43,8	1,530
4,0	12	51,8	1,580
Disperse Red 13			
0,2	30	36,2	1,506
0,4	19	42,8	1,504
1,0	20	41,2	1,536
2,0	29	39,0	1,530
4,0	20	42,0	1,546

[a] 1000 BN foram analisadas por cultura

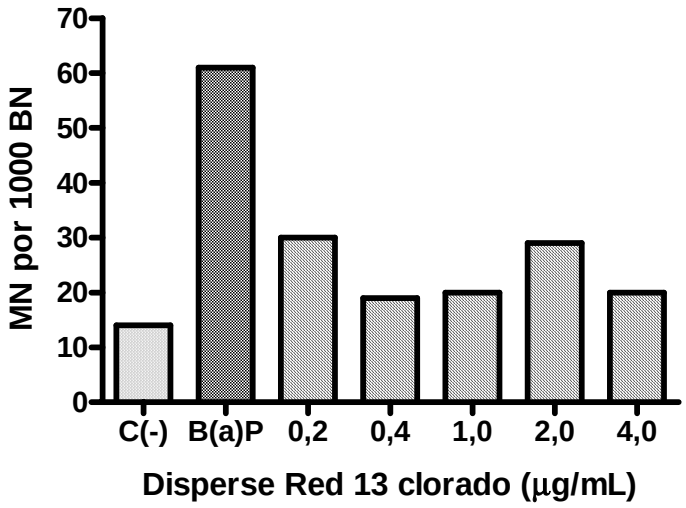


FIGURA 9. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações solução clorada do corante Disperse Red 13. Os resultados expressam o número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=1).

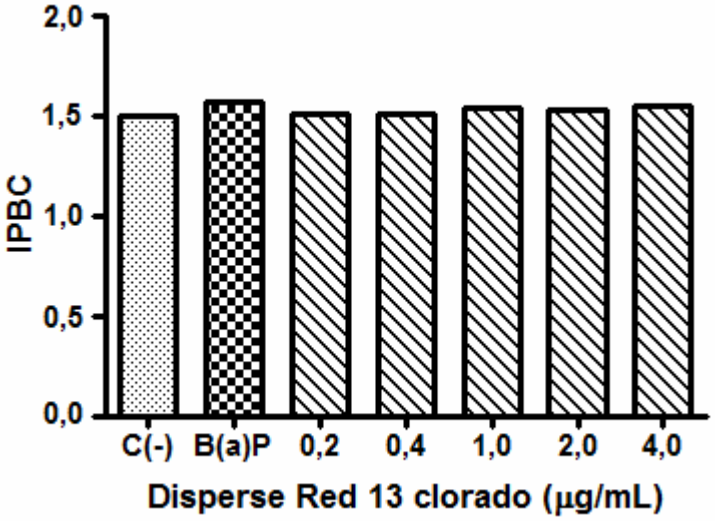


FIGURA 10. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Red 13. Em cada experimento foram analisadas 500 células (n=1).

4.3 Teste de viabilidade celular das soluções dos corantes após cloração e fotoeletrocatálise

O ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do corante trypan blue foi realizado 48 horas após as células $HepG_2$ terem sido mantidas em contato com as soluções cloradas e fotoeletrocatalisadas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13. A finalidade deste teste foi apenas avaliar se a porcentagem das células viáveis era suficiente para prosseguir os ensaios de mutagenicidade. 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).

Nesse método foram analisadas as seguintes concentrações das soluções cloradas e fotoeletrocatalisadas dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1: 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 µg/mL e Disperse Red 13: 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 µg/mL

Os resultados da viabilidade celular para os corantes clorados estão expressos nas Figuras 11, 12 e 13 e, a partir deles pode-se observar que não houve redução significativa nas condições do ensaio da viabilidade celular em nenhuma cultura tratada com as soluções dos corantes após cloração, sendo que todas as viabilidades celulares foram superiores a 90% nas concentrações testadas.

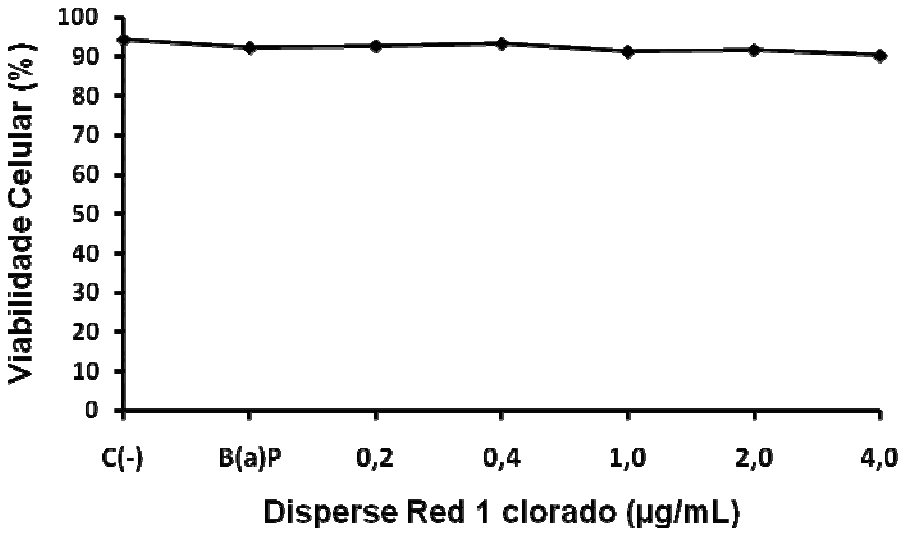


FIGURA 11. Método de exclusão pelo trypan Blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com o corante Disperse Red 1 após cloração. Os resultados representam a média de três repetições.

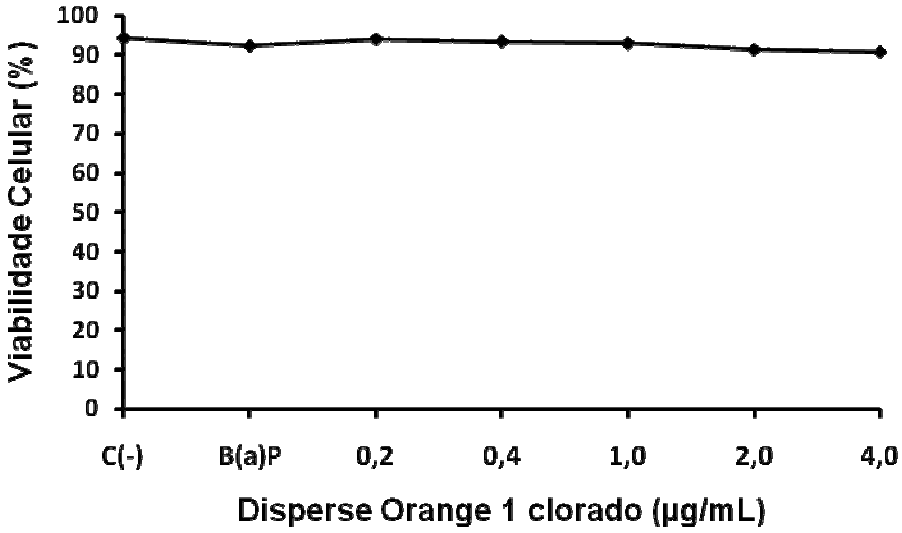


FIGURA 12. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com o corante Disperse Orange 1 após cloração. Os resultados representam a média de três repetições.

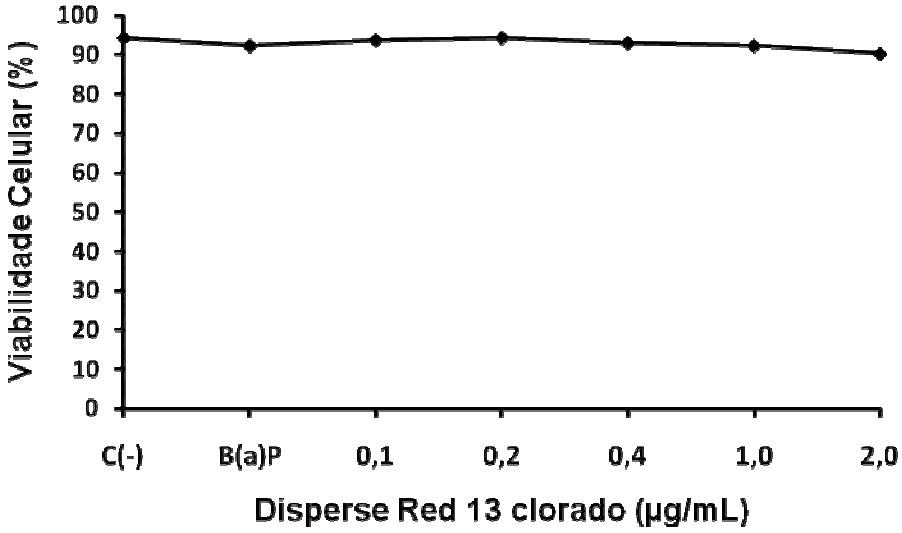


FIGURA 13. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Red 13 após cloração. Os resultados representam a média de três repetições.

As Figuras 14, 15 e 16 demonstram a porcentagem de células HepG2 viáveis após a exposição a soluções fotoeletrocatalisadas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13. Os resultados indicam que em todos os

tratamentos, as viabilidades celulares analisadas foram superiores a 80% indicando que era possível dar prosseguimento ao ensaio.

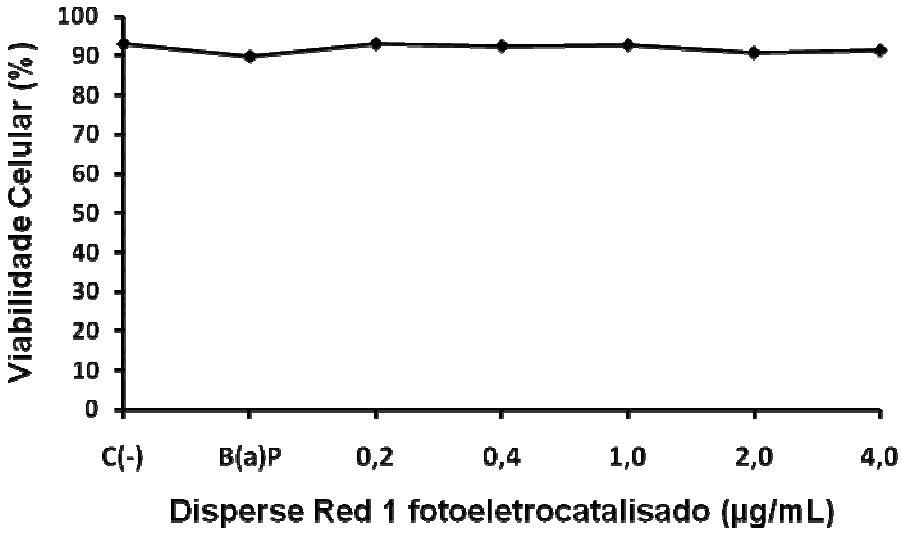


FIGURA 14. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Red 1 após fotoeletrocatálise. Os resultados representam a média de três repetições.

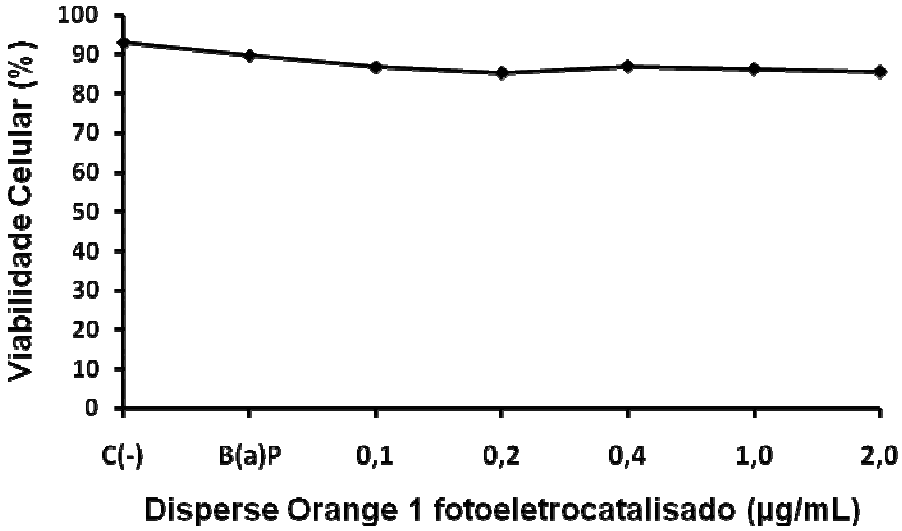


FIGURA 15. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Orange 1 após fotoeletrocatálise. Os resultados representam a média de três repetições.

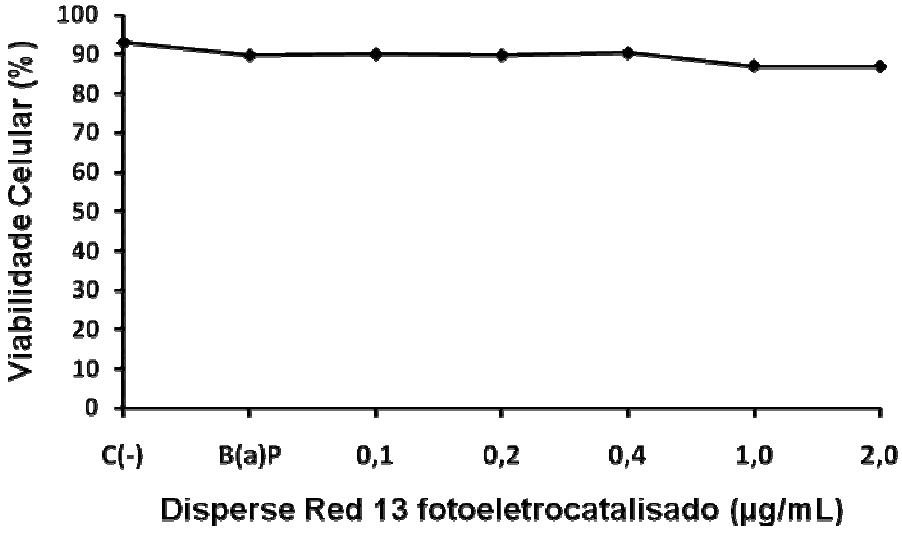
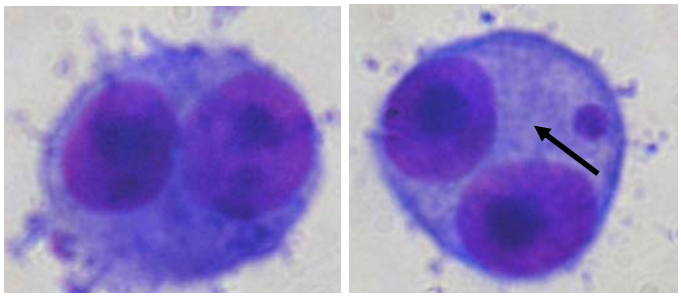


FIGURA 16. Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise. Os resultados representam a média de três repetições.

4.4 Avaliação da mutagenicidade dos corantes após a cloração

Primeiramente, analisou-se o efeito do tratamento por cloração na mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 pelo ensaio do micronúcleo em células HepG2.

As fotos ilustradas na Figura 17 mostram duas células Método de exclusão pelo trypan blue para verificar a viabilidade celular das culturas de $HepG_2$ tratadas com a solução do corante Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise.binucleadas obtidas em nosso experimento, sendo que a foto (A) é uma célula sem dano genético, já a célula (B) contém um micronúcleo.



(A) **(B)**

FIGURA 17. Fotomicrografias de células $HepG_2$ com aparência binucleada sem a presença de micronúcleo (A) e na qual foi induzida a formação de micronúcleo (B), obtidas no presente trabalho. Visualização em aumento 100x. Coloração Giemsa.

A Tabela 3 mostra a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições e contêm informações sobre o número de MN encontrados em 1000 BN, o IPBC e a porcentagem de BN em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações das soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração.

TABELA 3. Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleos em três repetições, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração.

Tratamentos (µg/mL)	MN[a] (média ± DP)	% BN (média ± DP)	IPBC (média ± DP)
Controle negativo	12,0 ± 2,64	43,9 ± 4,12	1,542 ± 0,06
B(a)P 75	41,0 ± 19,08**	44,3 ± 4,05	1,499 ± 0,06
Disperse Red 1			
0,2	13,3 ± 5,51	48,0 ± 7,67	1,625 ± 0,12
0,4	21,3 ± 11,00	51,7 ± 3,42	1,631 ± 0,09
1,0	17,7 ± 3,21	50,9 ± 2,40	1,596 ± 0,03
2,0	9,7 ± 5,51	48,8 ± 4,54	1,589 ± 0,08
4,0	8,0 ± 3,46	54,1 ± 8,26	1,609 ± 0,06
Disperse Orange1			
0,2	16,7 ± 10,02	43,9 ± 1,70	1,575 ± 0,04
0,4	11,3 ± 4,16	46,8 ± 5,48	1,586 ± 0,10
1,0	17,7 ± 12,90	48,7 ± 4,84	1,623 ± 0,09
2,0	15,3 ± 7,50	45,8 ± 3,99	1,611 ± 0,10
4,0	14,3 ± 4,93	53,5 ± 3,06	1,597 ± 0,04
Disperse Red 13			
0,1	16,0 ± 3,00	39,9 ± 2,32	1,489 ± 0,05
0,2	23,3 ± 5,89	42,0 ± 5,33	1,544 ± 0,05
0,4	19,6 ± 5,98	42,3 ± 4,10	1,527 ± 0,03
1,0	15,0 ± 5,73	41,1 ± 4,65	1,526 ± 0,04
2,0	12,3 ± 7,04	41,9 ± 0,92	1,517 ± 0,01

[a] 1000 BN foram analisadas por cultura
** Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$)

As Figuras 18, 19 e 20 mostram a freqüência de micronúcleos induzidos pelas soluções cloradas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração em cultura de células $HepG_2$, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e as figuras representam a média e o desvio padrão dos resultados. Os dados de cada repetição são mostrados no Apêndice B. Pode-se notar que houve um aparente aumento na freqüência de micronúcleos à medida que aumentava a concentração das soluções cloradas dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13. Este aumento ocorre até um limite de 0,2 µg/mL para a solução clorada do corante Disperse Red 13 e até 0,4 µg/mL para o corante Disperse Red 1 clorado. Já com o corante Disperse Orange 1 após cloração, aparentemente ocorre diminuição na média de micronúcleos induzidos inicialmente e, nas demais concentrações testadas este composto apresenta o mesmo comportamento dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 clorados. Entretanto, as Figuras 18,19 e 20 demonstram que a freqüência de micronúcleos induzidas pelas concentrações testadas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo.

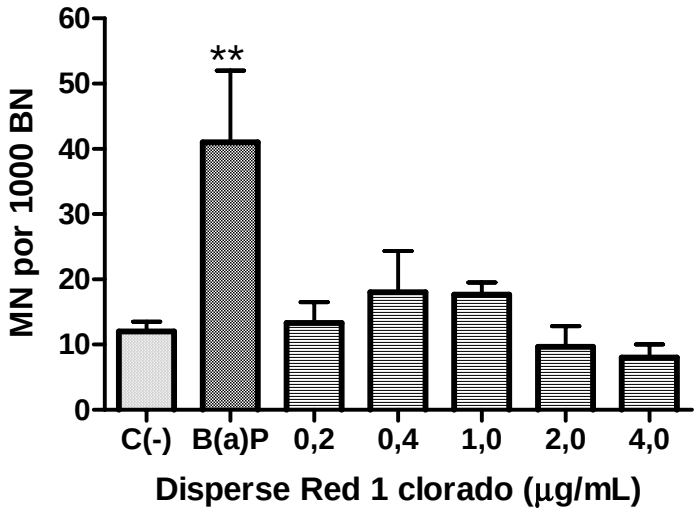


FIGURA 18. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Red 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). **Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

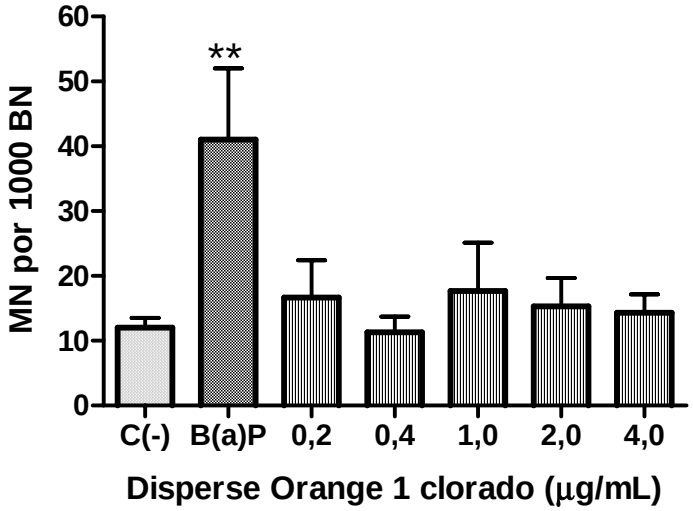


FIGURA 19. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Orange 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). **Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

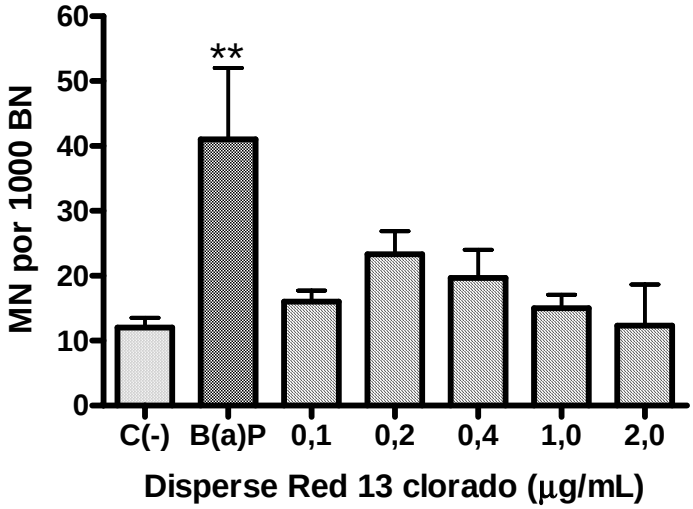


FIGURA 20. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução clorada do corante Disperse Red 13. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). **Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

As Figuras 21, 22 e 23 mostram os resultados do IPBC de cada concentração das soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração em culturas de células $HepG_2$. Observa-se que os índices de proliferação do bloqueio de citocinese das células tratadas com diferentes concentrações das soluções cloradas desses corantes não apresentaram diferenças estatísticas significativas em

relação ao controle negativo, embora durante a leitura das lâminas, foi observada uma redução no número de células nas concentrações mais altas o que pode indicar morte celular, ainda que o IBPC não tenha sido alterado. Este mesmo efeito foi observado por Chequer et al., 2009, em estudo dos mesmos corantes em sua forma original.

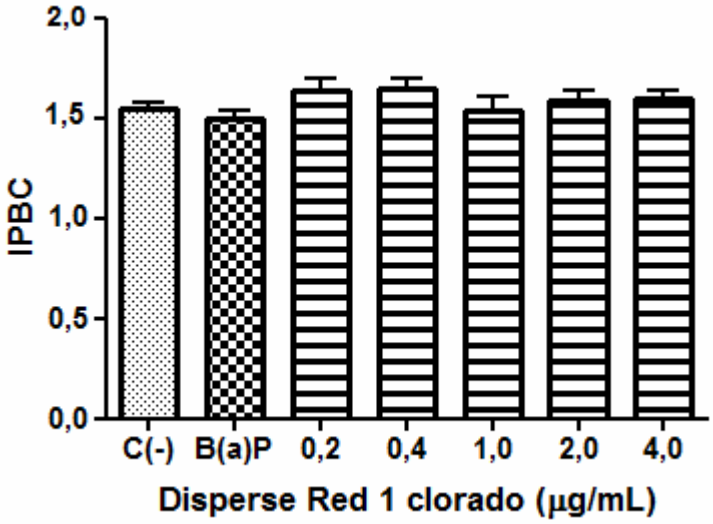


FIGURA 21. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 1 após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

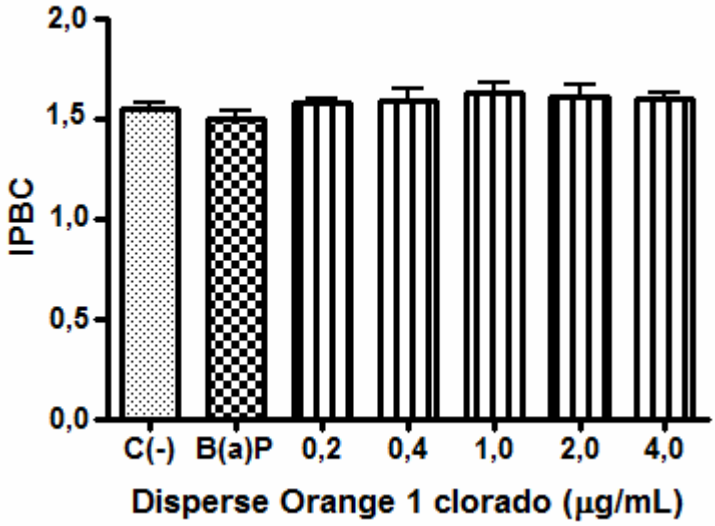


FIGURA 22. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Orange 1 após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

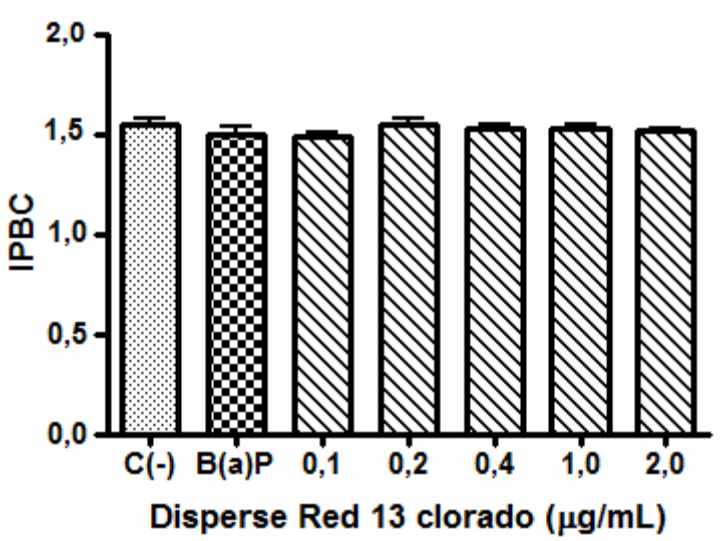


FIGURA 23. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 13 após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

4.4.1 Comparação do teste de micronúcleos dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 originais com as soluções aquosas dos mesmos corantes após tratamento por cloração

De acordo com Chequer (2008), os corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 são potencialmente mutagênicos para linfócitos de sangue periférico humano e para cultura de células $HepG_2$ (Anexos I e II).

Chequer et al. (2009) demonstraram em seus experimentos que os azo corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 aumentaram a freqüência de micronúcleos em células $HepG_2$ com efeito dose-dependente até um limite de 2,0 µg/mL, e que as concentrações 1,0 µg/mL e 2,0 µg/mL de ambos os corantes eram mutagênicas para as células $HepG_2$.

As Figuras 24 e 25 ilustram uma comparação entre os corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 originais (CHEQUER et al., 2009, CHEQUER, 2008) com os mesmos corantes após serem submetidos ao processo de cloração convencional. Pode-se observar que há uma redução no número de micronúcleos de ambos os corantes após o tratamento por cloração a partir da concentração de 0,2 µg/mL. A diminuição do número de micronúcleos para o corante Disperse Orange 1 clorado foi muito discreta (média de MN

para o Disperse Orange $1_{original}$ = 17 e Disperse Orange $1_{clorado}$ = 16,7). Esta redução torna-se mais visível na concentração de 1,0 µg/mL. As figuras abaixo também demonstram que houve redução na mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 (CHEQUER et al., 2009), já que suas doses potencialmente mutagênicas (1,0 µg/mL e 2,0 µg/mL) não apresentaram mais esta atividade após o procedimento de cloração.

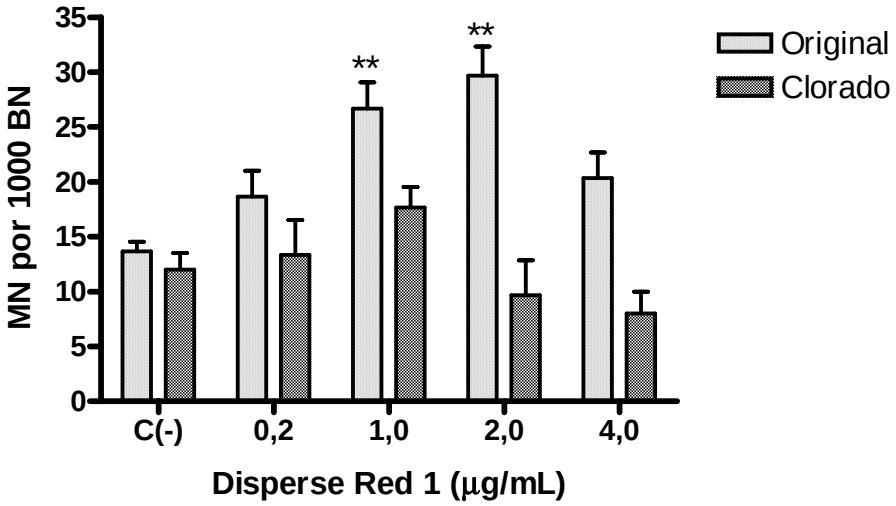


FIGURA 24. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução clorada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3).
** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo (p<0,01).

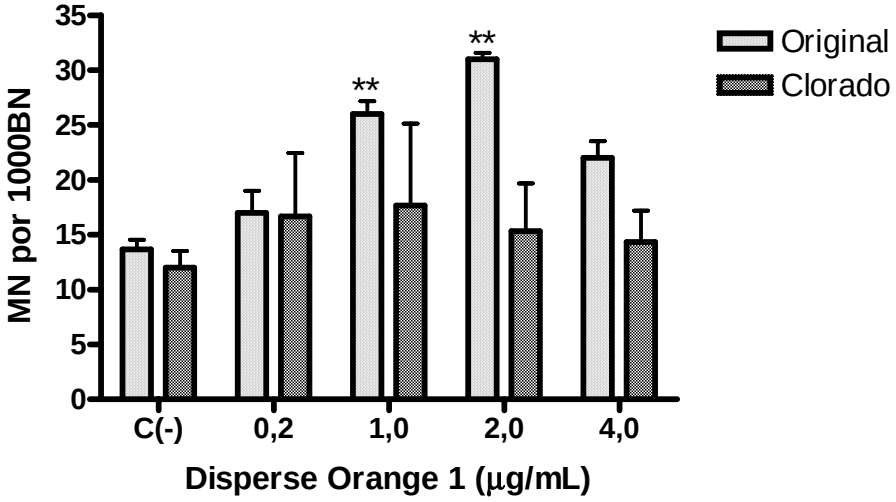


FIGURA 25. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução clorada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3).
** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo (p<0,01).

As Figuras 26 e 27 mostram os resultados dos IPBC dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 originais (CHEQUER et al., 2009) e após cloração em culturas de células $HepG_2$. A comparação entre os IPBC dos corantes originais (CHEQUER et al., 2009) e clorados revela que não há muitas alterações entre si e nem diferenças estatísticas significativas em relação aos seus respectivos controles negativos.

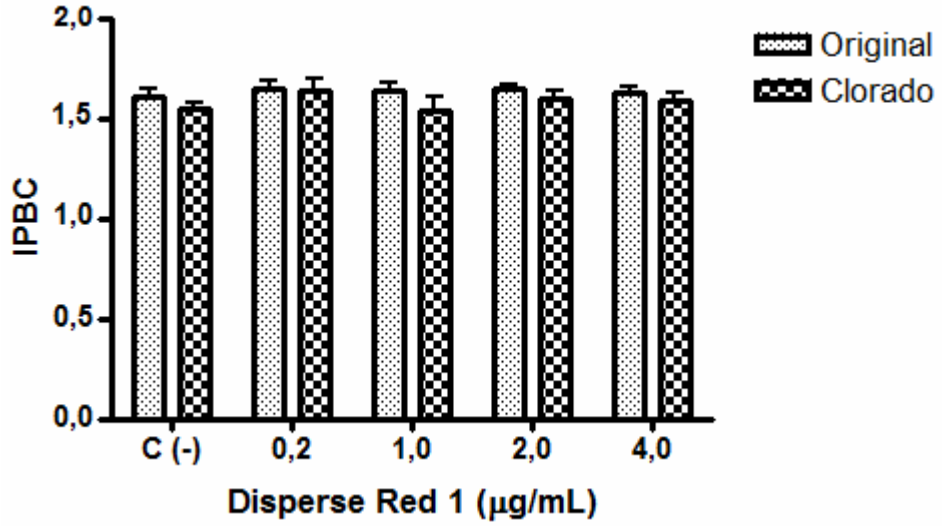


FIGURA 26. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os respectivos controles negativos.

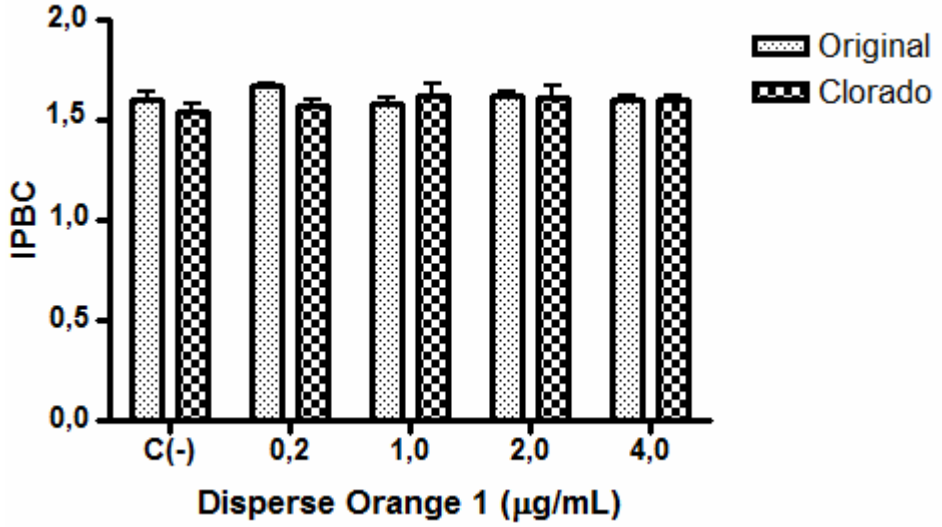


FIGURA 27. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al, 2009) e após cloração. Os resultados expressam a media e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os respectivos controles negativos.

No entanto, segundo Chequer et al. (2009), as doses mais altas dos azo corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 diminuíram a formação de micronúcleos, o que indicaria morte celular, mas o IPBC não foi alterado, sugerindo que este índice de proliferação do bloqueio da citocinese não é sensível suficiente para detectar este tipo de alteração.

A mutagenicidade do corante Disperse Red 13 foi analisada por Chequer (2008) através do ensaio de micronúcleos em linfócitos humanos e células $HepG_2$. Este corante apresentou um efeito dose-dependente até um limite de 1,0 µg/mL, já a partir desta concentração observa-se uma queda no número de micronúcleos, provavelmente causada por toxicidade celular. Esta análise revelou que as concentrações 1,0 µg/mL e 2,0 µg/mL do corante Disperse Red 13 eram mutagênicas para as células $HepG_2$ (CHEQUER, 2008)

A Figura 28 permite fazer uma análise comparativa entre o corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) com o mesmo corante após tratamento por cloração. Pode-se observar que há uma redução na mutagenicidade desse corante após o tratamento por cloração a partir da concentração de 1,0 µg/mL, sendo que esta é a dose na qual foi observada maior potência mutagênica do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008).

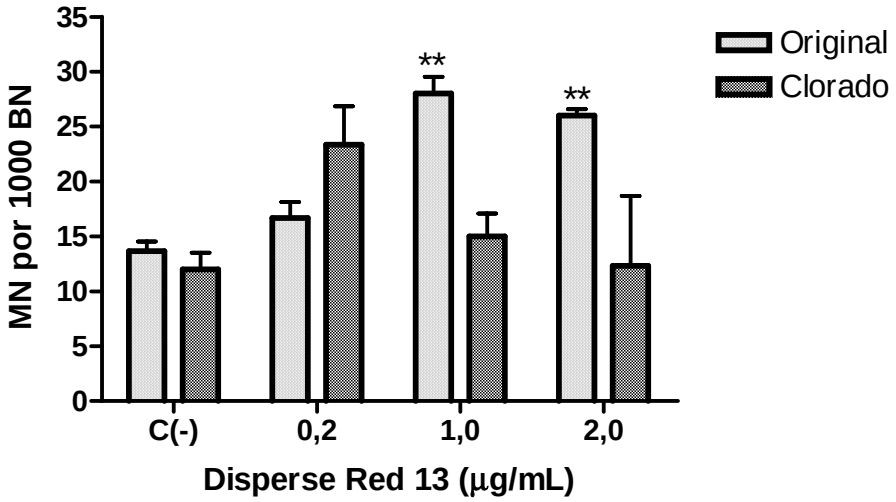


FIGURA 28. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e da solução clorada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3).
** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo ($p<0,01$).

Na concentração de 0,2 µg/mL, a média de MN para o corante original foi de 17 (CHEQUER, 2008) e para a solução clorada do corante foi de 23,3. Embora esses valores demonstrem um aumento na freqüência de MN para o corante após tratamento por cloração, este resultado não é relevante, pois esta concentração não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle negativo.

A Figura 29 mostra o resultado do IPBC do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e após cloração em culturas de células $HepG_2$. Observa-se que os índices de proliferação do bloqueio da citocinese dos corantes original (CHEQUER, 2008) e clorado não apresentaram muitas alterações entre si e nem diferenças estatísticas significativas em relação aos seus respectivos controles negativos.

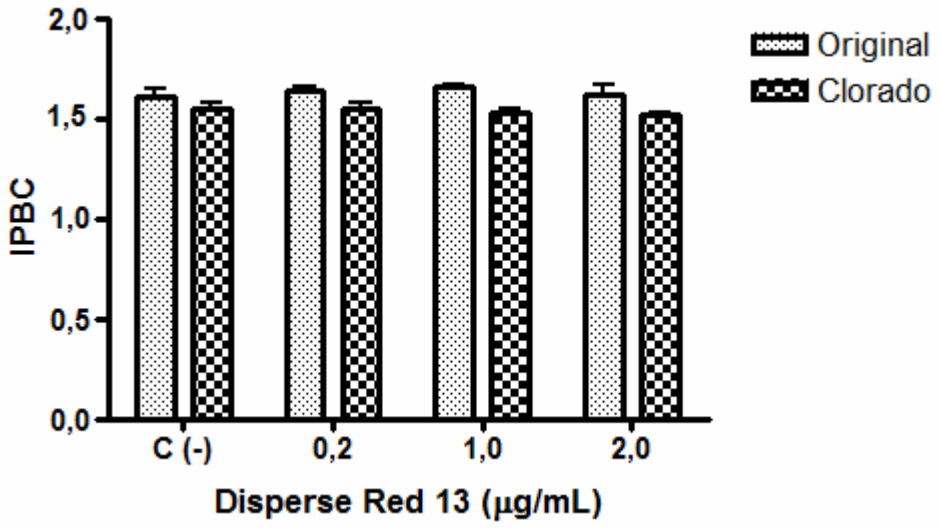


FIGURA 29. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e após cloração. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os respectivos controles negativos.

4.5 Avaliação da mutagenicidade dos corantes após a fotoeletrocatálise

Vários trabalhos têm mostrado a ineficiência da cloração na degradação e na remoção da mutagenicidade de corantes. Segundo Osugi et al. (2009) soluções aquosas contaminadas com os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 tratadas com o procedimento convencional de cloração mostraram que este método não é eficiente na remoção da mutagenicidade causada pelos corantes, e ainda promove um aumento da atividade mutagênica do corante Disperse Red 13, confirmada pelo ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* utilizando a linhagem TA98 na presença de atividade metabólica exógena (com S9). Por esta razão, o desenvolvimento de tecnologias destrutivas e métodos que promovam a completa mineralização de compostos orgânicos é altamente relevante para o tratamento de efluentes têxteis.

Assim, este trabalho avaliou o efeito da técnica fotoeletrocatalítica, recentemente desenvolvida pelo grupo da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni do Instituto de Química da UNESP – Araraquara na mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 pelo ensaio de micronúcleos em células $HepG_2$.

A Tabela 4 mostra a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições e contém informações sobre o número de MN encontrados em 1000 BN, o IPBC e a porcentagem de BN em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações das soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após tratamento por fotoeletrocatálise.

TABELA 4. Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleos em três repetições, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (%BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em cultura de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise.

Tratamentos (µg/mL)	MN[a] (média ± DP)	% BN (média ± DP)	IPBC (média ± DP)
Controle negativo	17,3 ± 5,69	48,7 ± 5,70	1,566 ± 0,11
B(a)P 75	36,7 ± 8,74*	42,9 ± 3,51	1,488 ± 0,02
Disperse Red 1			
0,2	15,7 ± 6,35	43,3 ± 6,00	1,561 ± 0,11
0,4	11,3 ± 4,04	41,9 ± 4,21	1,603 ± 0,13
1,0	10,7 ± 7,23	42,7 ± 2,77	1,531 ± 0,03
2,0	11,7 ± 9,86	44,2 ± 3,89	1,566 ± 0,08
4,0	10,7 ± 7,64	41,1 ± 3,43	1,533 ± 0,04
Disperse Orange 1			
0,2	18,0 ± 12,16	45,8 ± 1,59	1,558 ± 0,03
0,4	13,3 ± 2,52	48,6 ± 2,50	1,621 ± 0,05
1,0	15,0 ± 2,64	47,3 ± 5,28	1,583 ± 0,06
2,0	14,7 ± 12,22	44,3 ± 5,46	1,560 ± 0,07
4,0	20,0 ± 8,18	46,7 ± 1,62	1,560 ± 0,06
Disperse Red 13			
0,1	13,7 ± 6,51	49,7 ± 4,31	1,591 ± 0,05
0,2	19,7 ± 11,59	48,5 ± 1,63	1,623 ± 0,06
0,4	17,0 ± 5,20	48,1 ± 1,66	1,619 ± 0,13
1,0	19,3 ± 6,50	46,1 ± 2,60	1,567 ± 0,03
2,0	14,7 ± 2,08	48,1 ± 3,83	1,575 ± 0,08

[a] 1000 BN foram analisadas por cultura
* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$)

As Figuras 30, 31 e 32 demonstram a freqüência de micronúcleos induzidos pelas soluções fotoeletrocatalisadas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 em cultura de células $HepG_2$, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e as figuras representam a média e o desvio padrão dos resultados. Os dados de cada repetição são mostrados no Apêndice C. Pode-se observar que houve uma baixa indução de micronúcleos pelas diferentes concentrações testadas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise e que estas concentrações não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo.

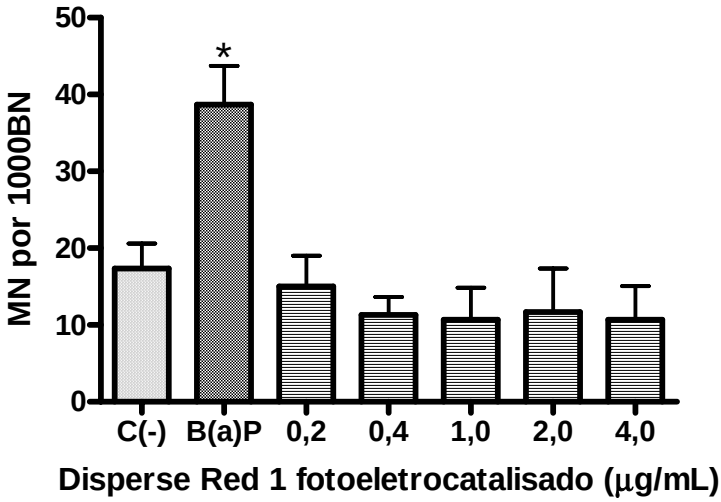


FIGURA 30. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução fotoeletrocatalisada do corante Disperse Red 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). * Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

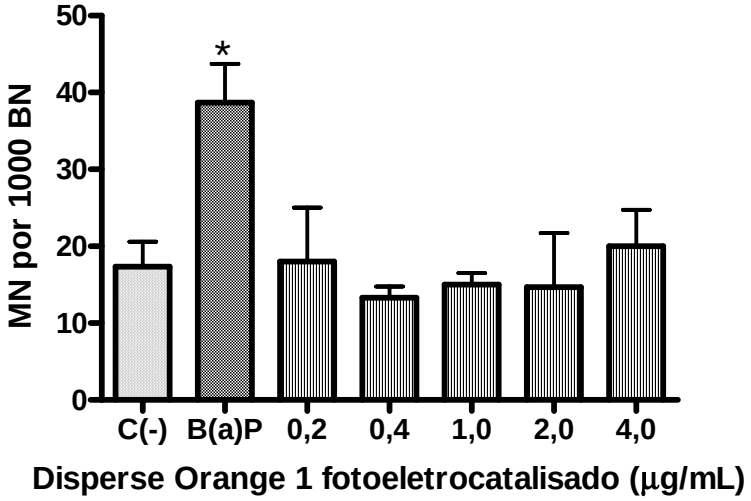


FIGURA 31. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução fotoeletrocatalisada do corante Disperse Orange 1. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). **Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

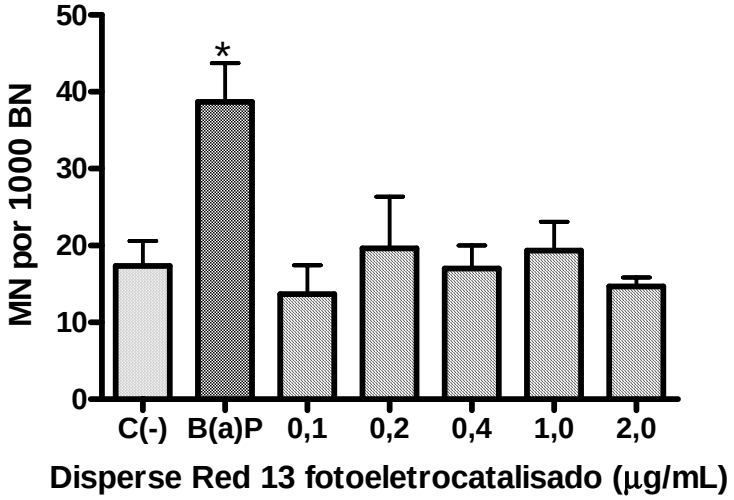


FIGURA 32. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações da solução fotoeletrocatalisada do corante Disperse Red 13. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3).
**Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

As Figuras 33, 34 e 35 mostram os resultados do IPBC de cada concentração das soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise em culturas de células $HepG_2$. Observa-se que os índices de proliferação do bloqueio de citocinese das células tratadas com diferentes concentrações das soluções fotoeletrocatalisadas desses corantes também não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo, indicando a ausência de potencial citotóxico das soluções de corantes testadas.

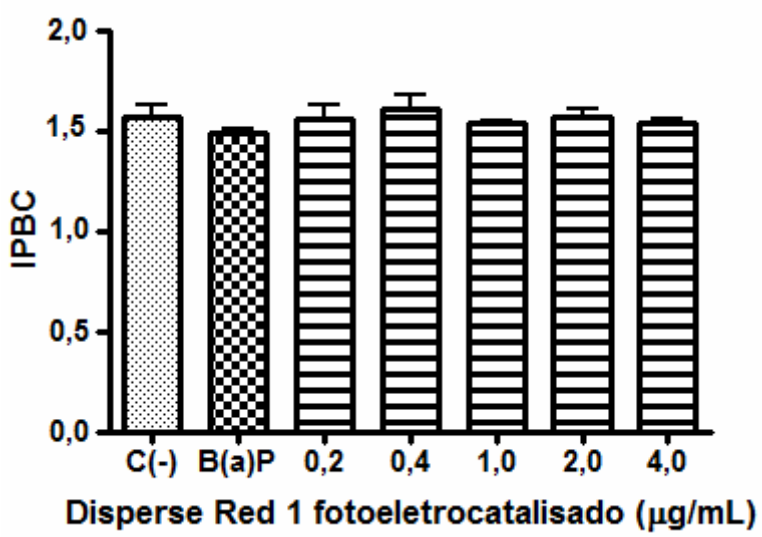


FIGURA 33. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 1 após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

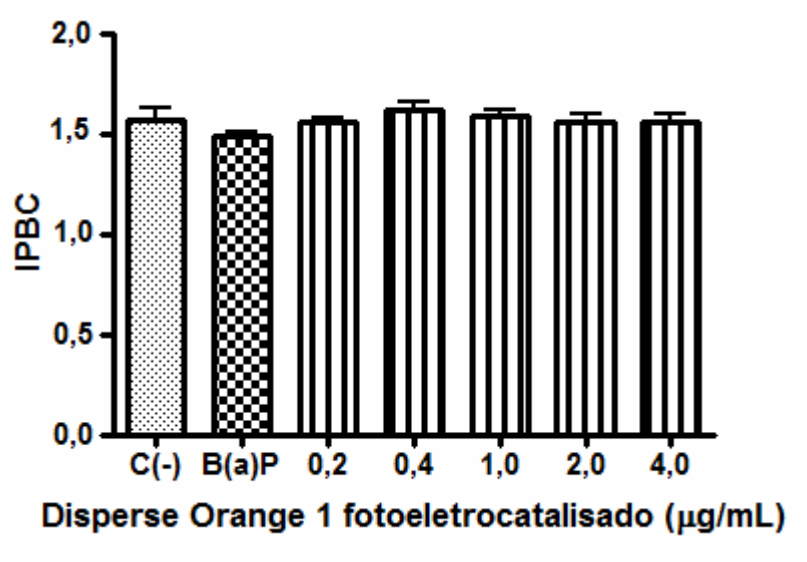


FIGURA 34. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Orange 1 após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

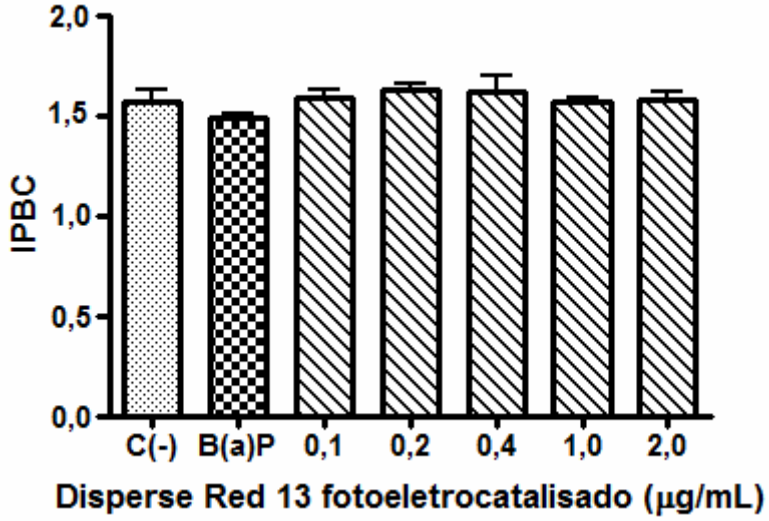


FIGURA 35. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações da solução do corante Disperse Red 13 após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

4.5.1 Comparação do teste de micronúcleos dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 originais com as soluções aquosas dos mesmos corantes após tratamento por fotoeletrocatálise

Como salientado acima, Chequer (2008) e Chequer et al. (2009) demonstraram que os corantes Disperse Red 13, Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 são potencialmente mutagênicos para linfócitos de sangue periférico humano e para cultura de células $HepG_2$ (Anexos I e II).

Chequer et al. (2009) observaram que os azo corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 aumentaram a freqüência de micronúcleos em células $HepG_2$ com efeito dose-dependente até um limite de 2,0 µg/mL. Neste trabalho, a Figura 36 mostra que o corante Disperse Red 1 após tratamento por fotoeletrocatálise reduziu a capacidade do corante em induzir a formação de micronúcleos nas diferentes concentrações testadas quando comparado ao corante original (CHEQUER et al., 2009). Ou seja, após a fotoeletrocatálise, foi observada a remoção da mutagenicidade do corante Disperse Red 1, que é potencialmente mutagênico para as células $HepG_2$ nas concentrações 1,0 µg/mL e 2,0 µg/mL (CHEQUER et al., 2009).

Igualmente acontece com os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 fotoeletrocatalisados. As Figuras 37 e 38 ilustram uma diminuição no número de micronúcleos para estes corantes, demonstrando que houve redução na mutagenicidade dos corantes Disperse Orange 1 (CHEQUER et al., 2009) e Disperse Red 13 (CHEQUER, 2008) originais, já que suas doses potencialmente mutagênicas (1,0 µg/mL e 2,0 µg/mL) não apresentaram mais esta atividade após o procedimento de fotoeletrocatálise.

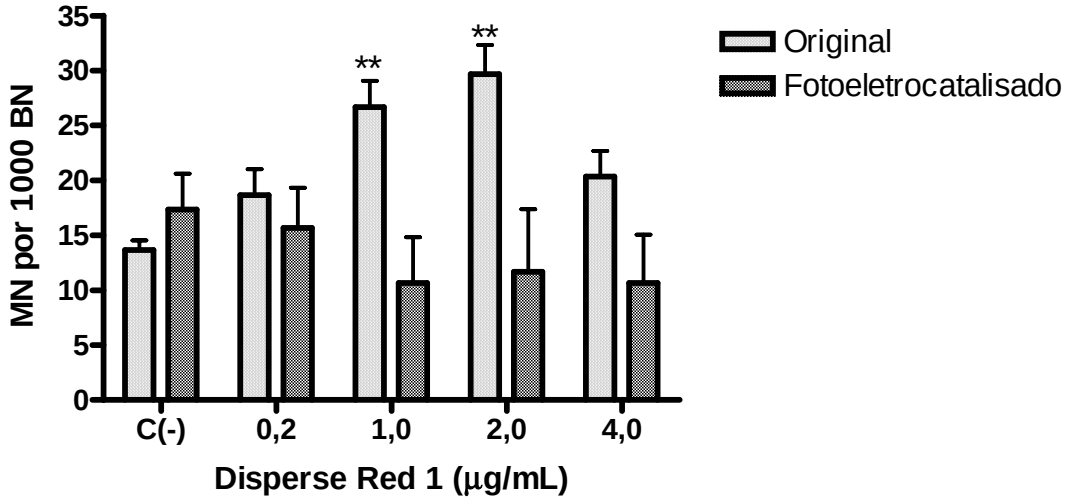


FIGURA 36. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). ** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo (p<0,01).

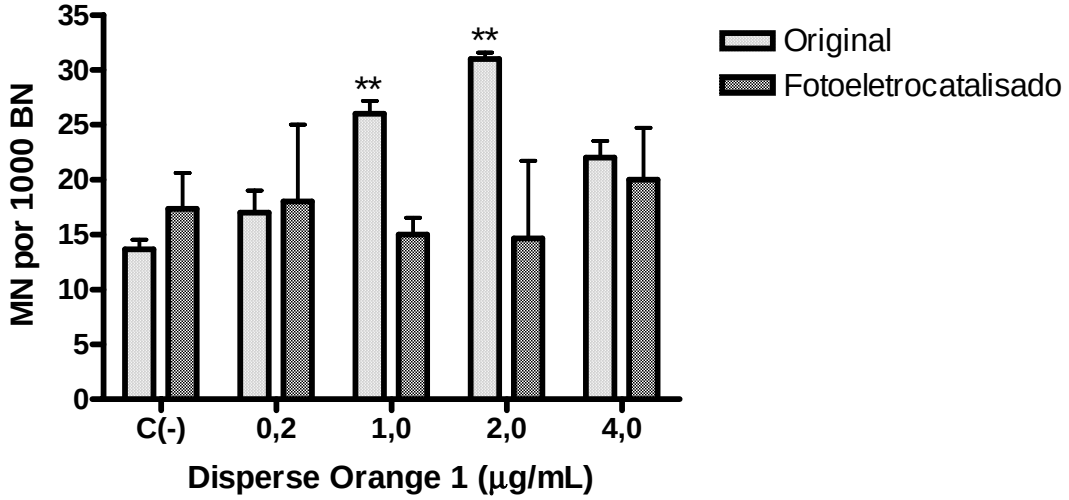


FIGURA 37. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009) e da solução fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). ** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo (p<0,01).

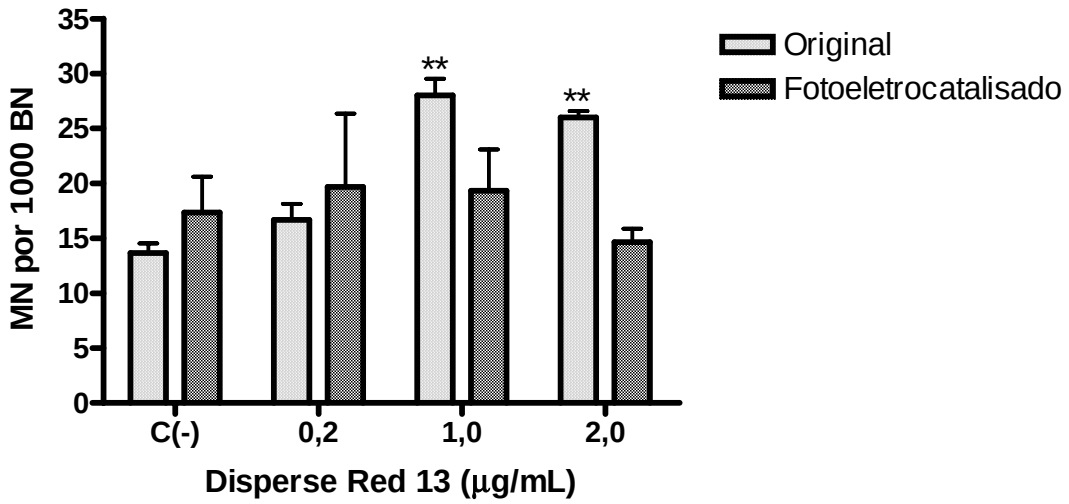


FIGURA 38. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e da solução fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3).
** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo ($p<0,01$).

As Figuras 39, 40 e 41 mostram os resultados dos IPBC dos corantes Disperse Red 13 (CHEQUER, 2008), Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 (CHEQUER et al., 2009) originais e após fotoeletrocatálise em culturas de células $HepG_2$. A análise comparativa entre os IPBC dos corantes originais (CHEQUER, 2008; CHEQUER et al., 2009) e fotoeletrocatalisados revela que não há muitas alterações entre si e nem diferenças estatísticas significativas em relação aos seus respectivos controles negativos.

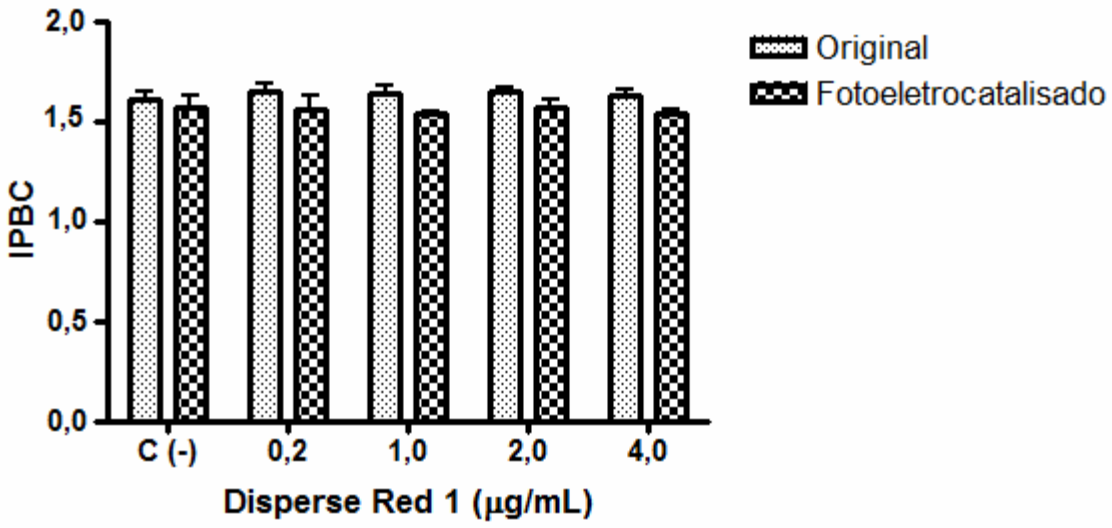


FIGURA 39. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009) e após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os respectivos controles negativos.

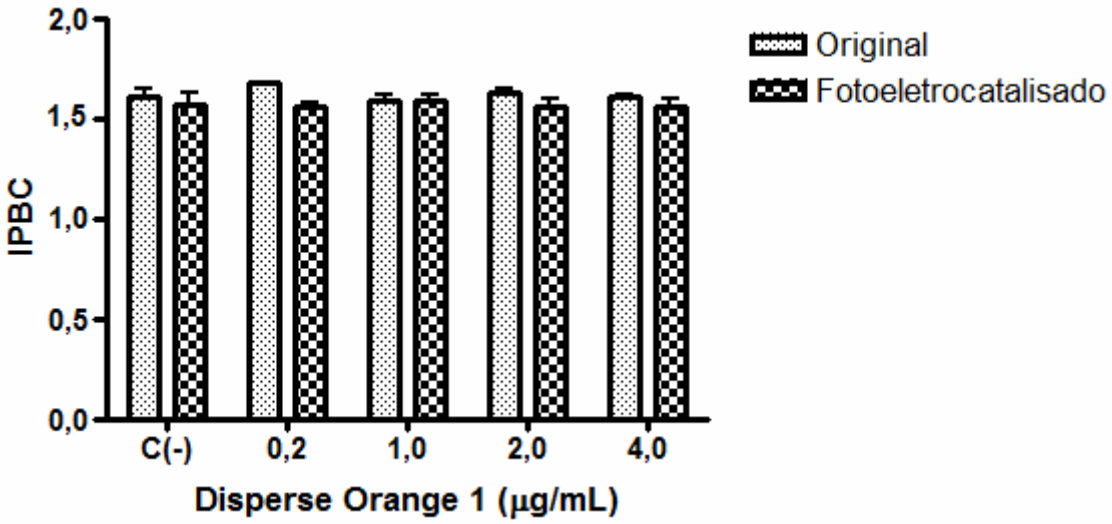


FIGURA 40. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009) e após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os respectivos controles negativos.

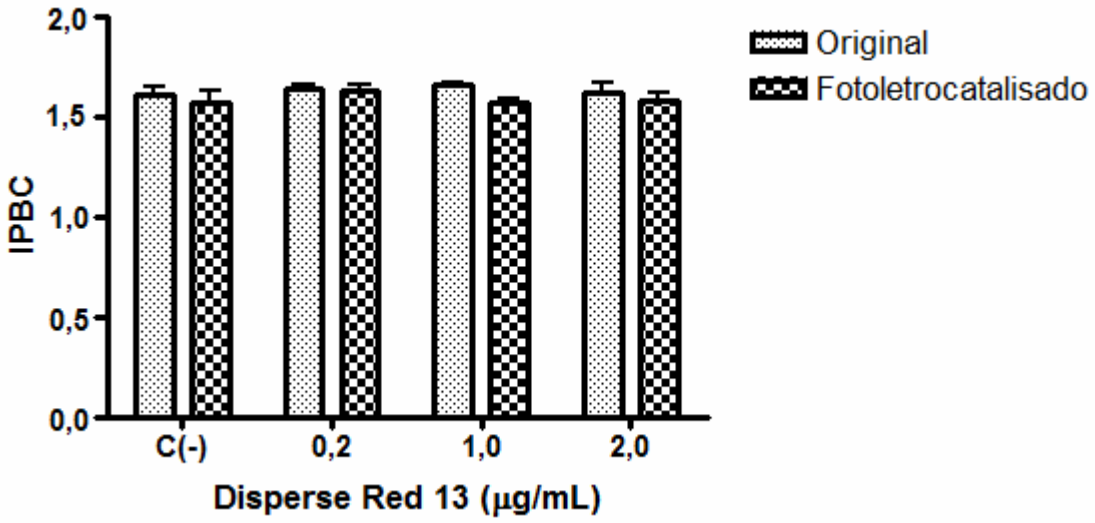


FIGURA 41. Índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células $HepG_2$ tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008) e após fotoeletrocatálise. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os respectivos controles negativos.

4.6 Comparação dos efeitos dos tratamentos por cloração e fotoeletrocatálise na mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13

Em função da problemática relacionada ao intenso uso de corantes é necessário que as indústrias têxteis busquem tecnologias mais eficazes para o tratamento de seus efluentes, visando o desenvolvimento sustentável e a minimização dos impactos ambientais.

Pizzolato et al. (2002) analisaram a eficiência do tratamento de um efluente têxtil por oxidação com hipoclorito de sódio (NaClO) e observaram que a remoção da cor era obtida rapidamente, mas que os corantes orgânicos não foram completamente oxidados e que muitos produtos de degradação foram encontrados no efluente tratado, incluindo os organoclorados.

Sarasa et al. (1998) investigaram o efluente de uma indústria que produz azo corantes e emprega a cloração como método de tratamento. As análises com

CG/MS e CG/FID identificaram alguns compostos organoclorados resultantes desse tratamento, entre ele: cloroanilinas, cloronitrobenzenos e clorofenóis, substâncias que oferecem risco à saúde humana.

Oliveira et al. (2006) investigaram a mutagenicidade encontrada no Ribeirão dos Cristais, região metropolitana de São Paulo, analisando soluções originais e cloradas do corante preto Black Dye Commercial Product (BDCP), encontrado neste corpo d'água. Tanto as soluções originais como as cloradas do BDCP que é constituído pelos corantes C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Orange 37 e C.I. Disperse Violet 93, apresentaram atividade mutagênica para o teste *Salmonella*/microssoma. Estes resultados sugerem que a mutagenicidade encontrada nas amostras de água para consumo do Ribeirão dos Cristais é, pelo menos em parte, provocada pelas soluções originais e cloradas do corante BDCP, o que indica a ineficiência da cloração na remoção da mutagenicidade desses compostos.

Dessa forma, devido às limitações dos métodos convencionais em promover a degradação e mineralização dos corantes, assim como a remoção da mutagenicidade desses compostos ou seus derivados, várias tecnologias e métodos têm sido desenvolvidos. Os processos oxidativos avançados (POAs) merecem especial destaque, como técnicas alternativas de tratamento de sistemas aquosos pela ação de radicais hidroxilas ou outras espécies radicalares capazes de oxidar compostos orgânicos em CO_2 e água, e assim garantir não só a proteção ambiental, mas também da saúde humana.

Zanoni, Sene e Anderson (2003) analisaram a degradação do corante reativo Remazol Brilliant Orange 3R após tratamento fotoeletrocatalítico e observaram que com 3 horas de fotoeletrocatálise o corante já estava praticamente mineralizado (70% de redução do Carbono Orgânico Total – TOC). Li et al. (2007) avaliaram a eficiência de três processos de degradação: fotocatálise, oxidação eletroquímica e fotoeletrocatálise, no tratamento de amostras de águas oriundas de um campo petrolífero. Os autores demonstraram que a fotoeletrocatálise exibiu a maior capacidade de reduzir a genotoxicidade da amostra e concluíram que este procedimento é o mais eficiente para degradar efluentes petrolíferos.

O presente trabalho fez uma análise comparativa da eficiência do procedimento de cloração química convencional com a fotoeletrocatálise na remoção

da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13.

As Figuras 42, 43 e 44 demonstram que as soluções aquosas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após cloração e fotoeletrocatálise promovem uma redução na freqüência de micronúcleos quando comparadas às concentrações dos corantes originais Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 que apresentam atividade mutagênica (1,0 µg/mL e 2,0 µg/mL para os três corantes), o que indica que tanto o tratamento por cloração química convencional como a fotoeletrocatálise foram eficientes na remoção da mutagenicidade causada pelos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 em cultura de células $HepG_2$.

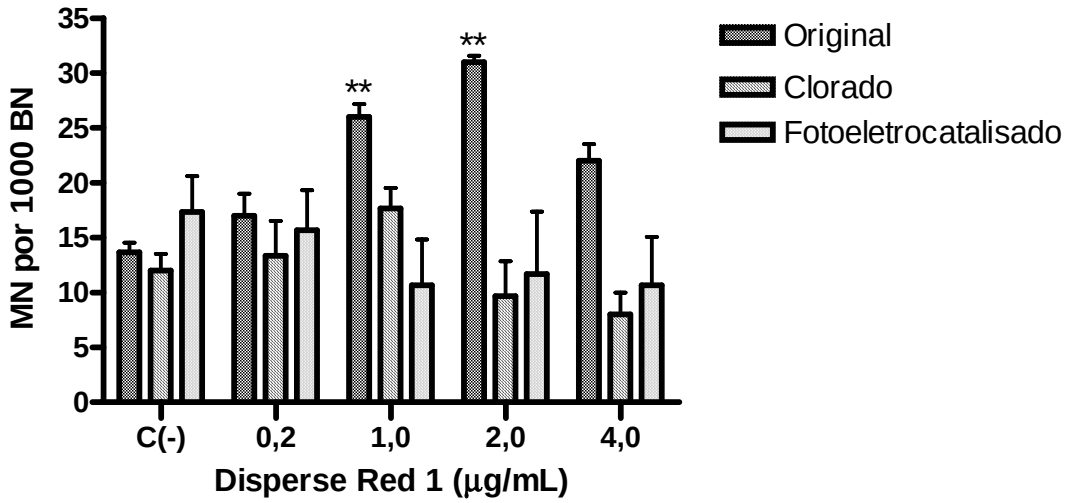


FIGURA 42. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 1 original (CHEQUER et al., 2009), da solução clorada e fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). ** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo ($p<0,01$).

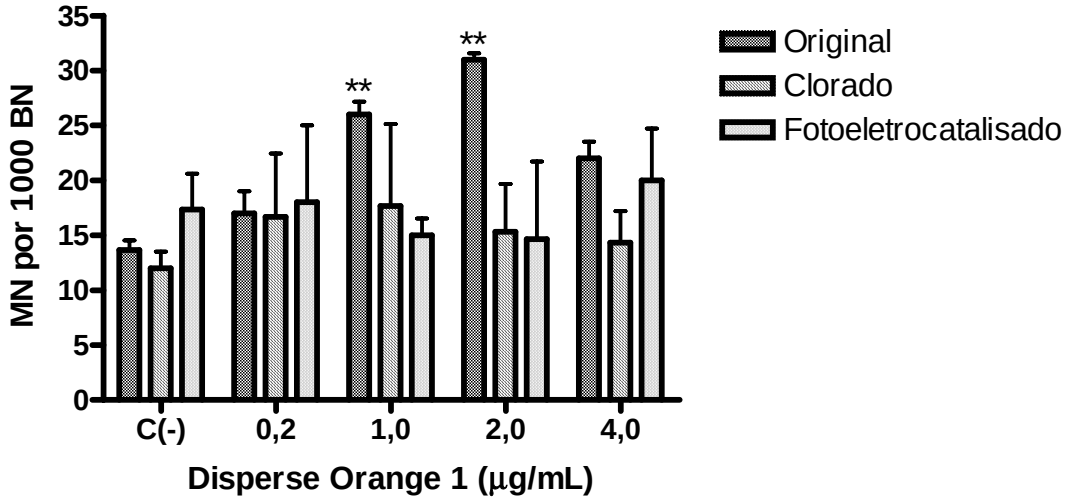


FIGURA 43. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Orange 1 original (CHEQUER et al., 2009), da solução clorada e fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). ** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo ($p<0,01$).

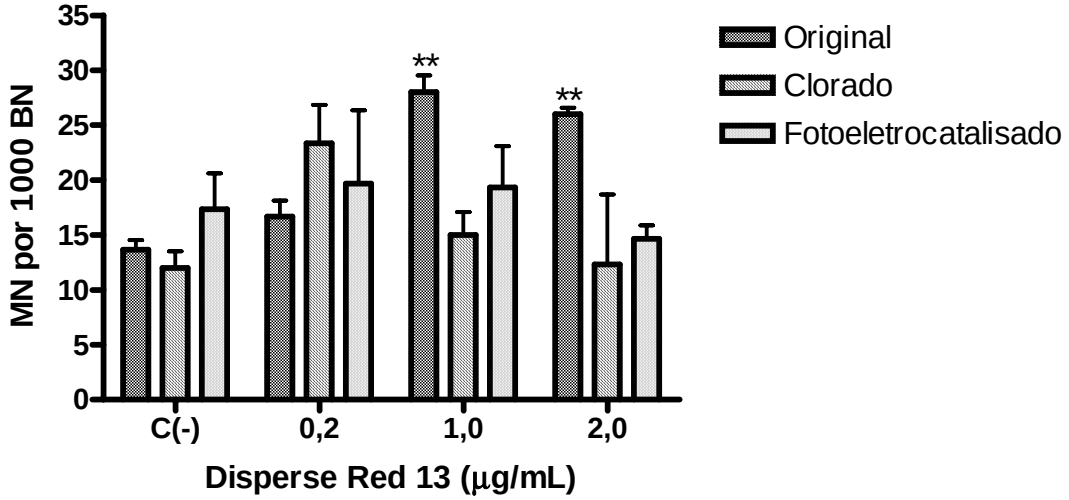


FIGURA 44. Indução de micronúcleos (MN) por diferentes concentrações do corante Disperse Red 13 original (CHEQUER, 2008), da solução clorada e fotoeletrocatalisada do mesmo corante. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de micronúcleos (MN) encontrados em 1000 células $HepG_2$ binucleadas (BN) (n=3). ** Estatisticamente diferente do respectivo controle negativo ($p<0,01$).

5. CONCLUSÕES

Nesse estudo foi investigado o potencial mutagênico dos produtos originados pelo processo de cloração química convencional e fotoeletrocatálise de amostras aquosas contendo os corantes mutagênicos Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13, e conseqüentemente, foi analisada a eficiência desses tratamentos por uma análise comparativa com os resultados obtidos pelo nosso grupo em experimentos realizados com os mesmos corantes originais. A análise do potencial mutagênico foi realizada por meio do teste de micronúcleos em células $HepG_2$. Assim, podemos concluir que:

- Os produtos gerados pelo processo de cloração química convencional e fotoeletrocatálise de amostras aquosas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 não induziram à mutações cromossômicas nas condições testadas;
- As soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 após tratamento por cloração e fotoeletrocatálise apresentaram uma diminuição na indução de micronúcleos quando comparadas com os corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1(CHEQUER et al., 2009) e Disperse Red 13 (CHEQUER, 2008), promovendo a remoção da atividade mutagênica desses corantes. Esta remoção do potencial mutagênico dos corantes originais pelo processo de cloração ocorreu a partir da concentração de 1,0 µg/mL para os três corantes;
- Considerando que as freqüências de MNs para as soluções cloradas e fotoeletrocatalisadas dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 não foram significativamente diferentes dos respectivos controles negativos, podemos concluir que os tratamentos por cloração e fotoeletrocatálise são eficientes na remoção da mutagenicidade dos corantes originais, em relação à indução de micronúcleos.
- Assim, a cloração química pode ser um processo útil no tratamento de efluentes industriais contaminados com os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13; e devido a capacidade de mineralização de poluentes orgânicos, a fotoeletrocatálise, aparentemente, é uma alternativa promissora no tratamento de efluentes têxteis e água bruta.

- Vale ressaltar que o ensaio utilizado neste trabalho avalia apenas um mecanismo de mutagenicidade, sendo assim, para confirmar a remoção do efeito por meio da cloração e fotoeletrocatálise, é necessária a realização de outros ensaios de mutagenicidade/genotoxicidade, utilizando *endpoints* diferentes. Esses ensaios estão sendo realizados por nosso grupo.

6. REFERÊNCIAS

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E. G.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, p. 111-172, 2000.

AL-SABTI, K. Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** Amsterdam, p.149-155, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM), Brasília. **História**. Disponível em: < http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp> Acesso em: 25 de novembro de 2008.

BANDARA, J.; WANSAPURA, P.T.; JAYATHILAKA, S.P.B. Indium tin oxide conducting glass electrode for electrochemical destruction of textile colorants. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 4161-4166, 2007.

BANNI, M.; BOURAOUI, Z.; GHEDIRA, J.; CLERANDEAU, C.; GUERBEJ, H.; NARBONNE, J.F.; BOUSSETA, H. Acute effects of benzo[a]pyrene on liver phase I and II enzymes, and DNA damage on sea bream *Sparus aurata*. **Fish Physiol Biochem**, v. 35, p. 293-299, 2009.

BAYO, J.; ANGOSTO, J.M.; GÓMEZ-LÓPEZ, M.D. Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wasterwater by Vibrio fischeri bioassay after a chlorination-dechlorination process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n.1, p. 166-171, 2009.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.; CHANG, W.P.; HOLLAND,N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v. 543, p. 155-166, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 518/GM, 25 de março de 2004. *Diário Oficial da União*. Brasília, 2004 março, seção 1, p. 266-270.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Classifica as águas do Território Nacional. Resolução n. 357, 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*. Brasília, 2005 março, seção 18, p. 58-63.

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. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**: USP, 2008. 120 páginas. Dissertação (mestrado). Programa de Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

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 Red1 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.; STEVENS, S.E.; CERNIGLIA, C.E. The reduction of azo dyes by intestinal microflora. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 175-190, 1992.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

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: 10/05/2009.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research,** Amsterdam, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research,** Amsterdam, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. PROTOCOL: Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols,** Australia, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

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

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

FENECH, M.; HOLLAND, N.; WUSHOU, P.C.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human MicroNucleus Project – An internacional collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 428, 271-283, 1999.

FENECH, M.; NEVILLE, S.; RINALDI, J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. **Mutation Research,** Amsterdam, v. 313, p. 203-207, 1993.

FERRAZ, E.A. **Comparação da mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade com *Salmonella***: USP, 2008. 102 páginas. Dissertação (mestrado). Programa de Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

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, 1998 , cap. 7, p.170-196, ed. sexta.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER J.H; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Mutação Cromossômica I: Alterações na Estrutura Cromossômica in:_ **Introdução à Genética**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998 , cap. 8, p.197-232, ed. sexta.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C; GELBART, W.M; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H.. Mutação, reparo, e recombinação in: _ **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 14, p.432-459, ed. oitava.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C; GELBART, W.M; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H.. Mudanças cromossômicas em larga escala in: _ **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap 15, p.461-499, ed. oitava.

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

HASHIMOTO, Y.; WATANABE, H.; DEGAWA, M. Mutagenicity of methoxyl derivatives of N-hydroxy-4-amino-azobenzenes and 4-nitroazobenzene. **Gann**, v.68, p. 373-374, 1977.

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

JOLLES, B.; DEMERSEMAN, P.; CHALVET, O.; STRAPELIAS, H.; HEMING, T.; ROYER, R.; DUQUESNE, M. Reactivity with DNA of three pyrenofuran analogues of benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene. **Nucleic Acids Research,** v. 15, n. 22, p. 9487-9497, 1987.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDEMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v.402, p. 185-202, 1998.

KONSTANTINOU, 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.

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

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.

LAMY, E.; GMINSKI, F.; SCHMEISER, H.H.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. **Toxicol. Lett.**, v. 146, n. 2, p. 103–109, 2004.

LAMY, E.; SCHRODER, J.; PAULUS, S.; BRENK, P. STAHL, T.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Antigenotoxic properties of Eruca sativa (rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2415–2421, 2008.

LI, G.; AN, T.; NIE, X.; SHENG, G.; ZENG, X.; FU, J.; LIN, Z.; ZENG, E.Y. Mutagenicity assessment of produced water during photoelectrocatalytic degradation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 416-423, 2007.

LORGE, E.; HAYASHI, M.; ALBERTINI, S.; KIRKLAND, D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. **Mutation Research**, v. 655, p. 1–38, 2008.

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.

MAZZO, T.M.; SACZK, A.A.; UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V.B. Analysis of Aromatic Amines in Surface Waters Receiving Wastewater from a Textile Industry by Liquid Chromatographic with Electrochemical Detection. **Analytical Letters**, v. 39, n. 14 , p. 2671 – 2685, 2006.

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.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagen/carcinogens. **Mutagenesis,** v. 6, p. 399-403, 1991.

NOGUEIRA, R.F.P.; JARDIM, W.F. A fotocatálise heterogênea e sua aplicação ambiental. Química Nova, v. 21, n. 1, p. 69-72, 1998.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 444, p. 175–180, 1999.

OLIVEIRA, D.P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais - um estudo de caso:** USP, 2005. 120 páginas. Tese (doutorado). Programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; RECH, C.M.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic compounds generated from the chlorination of disperse azo-dyes and their presence in drinking water. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 6682-6689, 2006.

OLIVEIRA, D. P.; CARNEIRO, P. A.; SAKAGAMI, M. M.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent - identification of the mutagenic components. **Mutation Research**. **Genetic Toxicology** and **Environmental Mutagenesis**,v. 626, p.135-142, 2007.

OSUGI, M. E.; RAJESHWAR, K., FERRAZ, E.R.A.; OLIVEIRA, D.P.; ARAÚJO, A. R.; ZANONI, M.V.B. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photoelectrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 2086-2093, 2009.

OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A.; ANDERSON. M.A.; ZANONI, M.V.B. Degradation of matallophtalocyanine dye bu combined processes of electrochemistry and photoelectrochemistry. **Electrochimia Acta,**v. 50, p. 5261-5269, 2005.

OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A.; CASTRO, F.J.V.; ZANONI, M.V.B. Photoelectrocatalytic oxidation of remazol turquoise blue and toxicological assessment of its oxidation products. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 871-877, 2006.

PASCHOAL, F.M.M.; ANDERSON, M.A.; ZANONI, M.V.B. Photoeletrocatalytic Oxidation of Anionic Surfactant used in Leather Industry on Nanoporous Ti/TiO_2 Eletrodes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 4, p. 803-810, 2008.

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.

PIZZOLATO, T.M.; CARISSIMI, E.; MACHADO, E.L.; SCHNEIDER, I.A.H. Colour removal with NaClO of dye wastewater from an agate-processing plant in Rio Grande do Sul, Brazil. **International Journal Mineral Processing**, v. 65, p. 203– 211, 2002.

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.; WILLINGTON 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.

RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; DEMARINI, D.M. Occurrence, genotoxicity and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. **Mutation Research**, v. 636, p. 178-242, 2007.

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: acritical 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. **Mutagênese Ambiental.** Canoas:Ulbra, 2003, p.201-223.

SCONCE, J.S. **Chlorine:** it´s manufacture, properties and uses. New York: Krieger ublising, 1972. 901p.

SHIOZAWA, T.; SUYAMA, K.; NAKANO, K.; NUKAYA, H. SAWANISHI, H.; OGURI, A.; WAKABAYASHI, K.; TERAO, Y. Mutagenic activity of 2-phenylbenzotriazole derivatives related to a mutagen, PBTA-1, in river water. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 442, p, 105-111, 1999.

SLOKAR, Y.M.; MARECHAL, A.M.L. Methods of Decoloration of Textile Wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 37, p. 335-356, 1998.

SOUZA, C.L.; ZAMORA, P. P. Degradação redutiva de azo-corantes utilizando-se ferro metálico. **Engenharia Sanitaria e Ambiental,** v.11, n. 1, p. 16-20, 2006.

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.

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.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213-225, 2000.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215-224, 1999.

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

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECK, C.M.; SATO, M.I.Z.; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, p. 1589-1597, 2004.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J.C.; BONA, A.M.L.; CHAGNONA, M.C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research,** Amsterdam, v. 536, p.79-90, 2003.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A .; FURLAN, M.; GUARATINI, C. C. I.; FOGG, A. G. Determination of the vinylsuphone azo dye, remazol brilliant orange 3R, by cathodic stripping voltametry. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, n. 1-3, p. 385-392, 1999.

ZANONI, M.V.B.; SENE, J.J.; ANDERSON, M.A. Photoelectrocatalytic degradation of Remazol Brilliant Orange 3R on titanium dioxide thin-film electrodes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 157, p.55–63, 2003.

ZOLLINGER, H. Syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. **Color chemistry**, New York: V.C.H. Publishers, 1991, p. 496, ed.segunda.