UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da mutagenicidade dos corantes Sudan III, Vat Green 3,
Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 por meio do ensaio de
micronúcleos em células HepG2**

Eloisa Silva de Paula

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da mutagenicidade dos corantes Sudan III, Vat Green 3,
Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 por meio do ensaio de
micronúcleos em células HepG2**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Eloisa Silva de Paula

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

*Versão corrigida da **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto
2012

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.

Paula, Eloisa Silva

Avaliação da mutagenicidade dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 por meio do ensaio de micronúcleos em células HepG2. Ribeirão Preto, 2012

59 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. Micronucleus assay. 2. Sudan III. 3. Vat Green 3. 4. Reactive Orange 16. 5. Reactive Black 5. 6. HepG2 cells.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Eloisa Silva de Paula

Título do trabalho: Avaliação da mutagenicidade dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 por meio do ensaio de micronúcleos em células HepG2

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

Dedico este trabalho aos meus pais, que com simplicidade e perseverança me ensinaram que a dedicação é fundamental para a concretização dos nossos sonhos.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Rosa e Hermínio, exemplos de humildade e dedicação, por sempre me incentivarem em todas as minhas escolhas, pelo amor incondicional e, sobretudo, por sempre acreditarem em minha capacidade.

Aos meus colegas de laboratório Gabriela, Thalita, Eduardo, Elisa, Farah e Klaus pela receptividade, amizade, atenção e disposição em ajudar. Agradeço especialmente à minha amiga Gisele, pela dedicação, paciência e ensinamentos que tornaram possível a realização deste trabalho.

Às minhas amigas de República Maria Elvira, Letícia e Larissa pela amizade, carinho, dedicação, torcida e pelos momentos de descontração.

À minha orientadora, Profa. Danielle, por quem tenho muito respeito e admiração, pela oportunidade e ensinamentos.

Às secretárias da Pós-graduação, Rosemary e Rosana, 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.

“Só podemos alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

PAULA, E.S. **Avaliação da mutagenicidade dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 por meio do ensaio de micronúcleos em células HepG2.** 2012. 59f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As cores sempre exerceram fascínio sobre a humanidade e, por toda a história, os compostos coloridos sempre foram considerados ferramentas atrativas nas atividades comerciais. Os corantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria têxtil, nas impressões de papel e fotografia, nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Estes compostos são considerados importantes contaminantes ambientais, representando sérios riscos à flora, fauna e ao ser humano. Apesar da grande quantidade de corantes disponíveis, os estudos sobre a toxicidade desses compostos são escassos e pouco se sabe a respeito dos efeitos genotóxicos destas substâncias. Dentro deste contexto, o presente trabalho avaliou o potencial genotóxico dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5, utilizando o Ensaio de Micronúcleos em células HepG2. Os corantes Sudan III e Reactive Orange 16 não induziram aumento, estatisticamente significativo, no número total de micronúcleos em relação aos controles, indicando assim que estes corantes não são capazes de induzir mutações cromossômicas no tipo celular e condições testadas. Entretanto, os corantes Vat Green 3 e Reactive Black 5 induziram mutagenicidade, concentrações de 10,0 e 25,0 µg/mL, e 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 µg/mL, respectivamente, demonstrada por um efeito concentração-dependente, no qual há um aumento de MNs até a concentração de 25,0 µg/mL para o Vat Green 3 e 0,5 µg/mL para o Reactive Black 5 com $p < 0,05$. Não foram observadas diferenças significativas entre os IDNs calculados para cada tratamento e controle dos corantes testados, indicando que esses corantes não interferem na proliferação celular das HepG2. Dessa forma, conclui-se que dos quatro compostos analisados, os corantes têxteis Vat Green 3 e Reactive Black 5 são capazes de induzir mutações cromossômicas em células HepG2 e, o potencial mutagênico do Reactive Black 5 é maior que o do Vat Green 3 no sistema celular avaliado, uma vez que foi capaz de induzir mutações, em concentrações menores. Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que cada um desses importantes contaminantes ambientais deve ser avaliado individualmente a fim de proteger o meio ambiente, garantindo assim a proteção da saúde humana.

Palavras-chave: Ensaio de micronúcleos, Sudan III, Vat Green 3, Reactive Black 5, Reactive Orange 16, Células HepG2.

ABSTRACT

PAULA, E.S. **Evaluation of the mutagenicity of the dyes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16, and Reactive Black 5 by using the micronucleus assay in HepG2 cells.** 2012. 59f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The colors have always caused fascination in mankind. Throughout history, colored compounds have always been considered attractive tools in industrial activities. The synthetic dyes are widely used in textile industry, paper and photography printing, in pharmaceutical, food, and cosmetic industries. These compounds are considered important environmental contaminants, and they can cause serious risks to wildlife and humans. Despite the large number of dyes available, studies on the toxicity of these compounds are scarce and little is known about the genotoxic effects of these substances. This study evaluated the genotoxic potential of the dyes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 and Reactive Black 5 using the micronucleus assay in HepG2 cells. The dyes Sudan III and, Reactive Orange 16, do not induce an increase statistically significant, in the total number of micronuclei when compared to controls. This result shows that these dyes are not able to induce chromosomal mutations in the cell type under the conditions tested. However, the dyes Vat Green 3 and Reactive Black 5 induced mutagenicity, following a dose-response effect, in which there is an increase of micronuclei until the concentration of 25.0 µg/mL for Vat Green 3 and 0.5 µg/mL for Reactive Black 5, with $p < 0.05$. There were no significant differences between the NDI calculated for each treatment and control of the dyes studied, indicating that these dyes do not interfere in HepG2 cell proliferation. Thus, the textile dyes Vat Green 3 and Reactive Black 5 are able to induce chromosomal mutations in HepG2 cells, and the dye Reactive Black 5 is more mutagenic than the dye Vat Green 3, since it induced mutations in cellular system tested at lower concentrations. The results of this study indicate that each one of these important environmental contaminants should be assessed individually in order to protect the environment, thus ensuring the protection of human health.

Keywords: Micronucleus assay, Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16, Reactive Black 5, HepG2 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais dos corantes Sudan III (A) e Sudan I (B)	5
Figura 2. Fórmula estrutural do corante Vat Green 3	5
Figura 3. Fórmula estrutural do corante Reactive Orange 16.....	6
Figura 4. Fórmula estrutural do corante Reactive Black 5	6
Figura 5. (A) Foto de uma célula binucleada contendo um micronúcleo (indicado pela seta), (B) Foto de uma célula binucleada. Aumento de 400 vezes. Coloração com Giemsa.....	9
Figura 6. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Sudan III. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com o solvente DMSO à 0,4%. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).....	21
Figura 7. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Vat Green 3. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3)	22
Figura 8. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Reactive Orange 16. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).	22
Figura 9. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Reactive Black 5. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).	23
Figura 10. Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 3,5; 8,7; 17,5; 26,2 e 35,0 µg/mL do corante Sudan III. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com o solvente DMSO na concentração de 0,4%. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).	25
Figura 11. Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 3,5; 8,7; 17,5; 26,2 e 35,0 µg/mL do corante Sudan III. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com o solvente DMSO na concentração de 0,4%. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).	26

- Figura 12.** Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL do corante Vat Green 3. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).....28
- Figura 13.** Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL do corante Vat Green 3. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).....29
- Figura 14.** Foto de uma célula binucleada contendo um micronúcleo (indicado pela seta), obtida durante a análise de MN induzidos pelo corante Vat Green 3. Aumento de 400 vezes. Coloração com Giemsa.30
- Figura 15.** Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL do corante Reactive Orange 16. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).31
- Figura 16.** Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL do corante Reactive Orange 16. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).....32
- Figura 17.** Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 µg/mL do corante Reactive Black 5. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).....34
- Figura 18.** Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 µg/mL do corante Reactive Black 5. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQUM	Associação Brasileira da Indústria Química
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
B(a)P	Benzo(a)pireno
BN	Célula binucleada
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	Chemical Abstract Service
cDDP	Cisplatina
CYP-450	Citocromo P-450
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ETAD	The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments and Manufacturers
HepG ₂	Linhagem celular derivada de hepatoblastoma
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDN	Índice de Divisão Nuclear
MEM	Minimum Essential Medium
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NDI	Nuclear Division Index
PBS	Tampão salina-fosfato
SBF	Soro Bovino Fetal

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Os corantes sintéticos.....	1
1.2. Os corantes estudados	4
1.3. O Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese em células HepG2	7
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Material	12
3.1.1. <i>Corantes estudados</i>	12
3.1.2. <i>Linhagem celular</i>	13
3.1.3. <i>Soluções utilizadas</i>	13
3.2. Métodos	15
3.2.1. <i>O Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese em células HepG2</i> ..	15
3.2.1.1. <i>Protocolo para cultivo e manutenção da cultura de células HepG2</i>	15
3.2.1.2. <i>Protocolo para a realização do Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio da citocinese em células HepG2</i>	16
3.2.2. <i>Teste de exclusão do corante Trypan Blue</i>	18
3.2.3. <i>Análise Estatística</i>	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Determinação da substância utilizada como controle positivo	20
4.2. Avaliação da viabilidade celular pela técnica de exclusão do corante Trypan Blue.....	21
4.3. Avaliação da mutagenicidade dos corantes estudados por meio do Ensaio de Micronúcleos em células HepG2	24

4.3.1. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III.....	25
4.3.2. Avaliação da mutagenicidade do corante Vat Green 3.....	28
4.3.3. Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Orange 16	31
4.3.4. Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Black 5.....	34
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICE.....	44
Resultados do Ensaio de MN em células HepG2 para o corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5.	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os corantes sintéticos

As cores sempre exerceram fascínio sobre a humanidade e há milhares de anos os corantes e pigmentos vêm sendo utilizados em decorações, sendo considerados importantes ferramentas atrativas nas atividades comerciais (REVISTA ELETRÔNICA DE QUÍMICA [QMCWEB], 2011; CHEMISTRY ENCYCLOPEDIA, 2012). Dentre os corantes de origem vegetal mais populares estavam os derivados de madeira, o açafrão e o índigo, e entre os de origem animal estava o *Tyrian purple* (WELHAM, 2000).

O corante natural índigo, extraído da planta *Isatis tinctoria*, foi muito utilizado no passado e ainda hoje é empregado na coloração de jeans (ABIQUIM, 2011). Este corante foi escolhido pelo Rei George II da Inglaterra para compor a cor do uniforme da marinha britânica (azul marinho) (CHEMISTRY ENCYCLOPEDIA, 2012). O corante *Tyrian purple*, derivado de um molusco, era notável pela sua resistência a luz e a lavagem, sendo considerado um importante marco de distinção social (CHEMISTRY ENCYCLOPEDIA, 2012).

No século XVI, os corantes desempenhavam um importante papel político e econômico e as nações européias procuram por novas fontes de cores e pelos segredos da aplicação das cores naturais (CHEMISTRY ENCYCLOPEDIA, 2012). O aumento acentuado no número de corantes disponíveis se deu devido ao advento da química sintética. O primeiro corante orgânico sintetizado foi o Mauve, obtido em 1856 na Inglaterra, por William H. Perkin, por meio da oxidação da fenilamina com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (SMITH; TE KANAWA, 2008; ABIQUIM, 2011).

A descoberta de Perkin mudou a história e ao longo das próximas décadas um imenso número de corantes foi sintetizado (WELHAM, 2000). Atualmente, esses compostos são amplamente utilizados em muitas áreas tecnológicas, dentre as quais podemos destacar os vários ramos da indústria têxtil, farmacêutica, cosméticos, plásticos, couros, fotográfica, automobilística, de papel e alimentícia. (SPADARO; GOLD; RENGANATHAN, 1992; RAJAGURU et al., 1999). Aproximadamente, 10.000 corantes e pigmentos são usados industrialmente e mais de 7×10^5 toneladas de corantes sintéticos são produzidos anualmente em todo o mundo (COUTO, 2009; SAHARAN; RANGA, 2011).

A enorme popularidade dos corantes sintéticos em detrimento aos corantes naturais pode ser justificada pelo seu menor custo, infinita possibilidade de síntese com diferentes grupos cromóforos e auxocrômicos ampliando a diversidade de cores e tonalidades, maior grau de pureza, alto controle da fidelidade da cor e maior fixação (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo e outros) ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado à fibra têxtil, no caso dos corantes têxteis. Os principais grupos de corantes classificados quanto ao modo de fixação são os reativos, os diretos, os azóicos, os ácidos, os dispersivos, os à cuba (vat), os pré-metalizados, os de enxofre e os branqueadores (GUARATINI; ZANONI, 2000). A seguir será feita uma breve descrição sobre os corantes reativos e à cuba, e também sobre os corantes que apresentam em suas estruturas o grupamento azo ou antraquinona, pois trata-se dos tipos de corantes estudados neste trabalho.

Os corantes reativos são utilizados principalmente no tingimento de fibras celulósicas, proteicas e poliamidas. Existem inúmeros tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos responsáveis pela cor (grupos cromóforos). Este grupo de corantes apresenta como características alta solubilidade em água e maior estabilidade na cor do tecido tingido, quando comparado a outros tipos de corante, o que ocorre devido à formação de ligação covalente entre o corante e a fibra (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes à cuba (ou vat) constituem uma importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigoides e antraquinoides. Eles são praticamente insolúveis em água, porém durante o processo de tintura eles são reduzidos com ditionito, em solução alcalina, transformando-se em um composto solúvel (forma leuco). Posteriormente, é oxidado e regenera a sua forma original sobre a fibra. Este tipo de corante apresenta alto custo e é utilizado principalmente na tintura de algodão (GUARATINI; ZANONI, 2000).

A classe de corantes antraquinona é a segunda mais importante entre os corantes têxteis, ficando atrás somente dos azo corantes. Esses compostos apresentam no grupo cromóforo $=C=O$ e $=C=C=$, formando o complexo antraquinona (JAMAL et al., 2011).

Já os azo corantes são compostos aromáticos, caracterizados por um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) (KONSTANTINO; ALBANIS, 2004; MANSOUR et al.,

2007). Os corantes pertencentes a este grupo são largamente utilizados no tingimento de náilon e poliéster (GUARATINI; ZANONI, 2000), plásticos, borrachas, e também nas indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêutica (RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997; GUARATINI; ZANONI, 2000; MANSOUR et al., 2007). Estima-se que mais de 800.000 toneladas de corantes sejam produzidas anualmente no mundo, sendo que desse montante cerca de 60 a 70% é composto pelos azo corantes (MANSOUR et al., 2007).

A grande preocupação relacionada aos azo corantes é devido aos seus efeitos poluentes e tóxicos, e à grande resistência à degradação (ZOLLINGER, 1991; ARSALAN; BALCIOGLU, 1999; ROBINSON et al., 2001). Segundo Tsuboy et al. (2007) a exposição humana aos azo corantes ocorre por meio do consumo de água contaminada ou do contato com a pele e, os metabólitos ativos dos azo corantes podem ser gerados nas células expostas por meio da ação de micro-organismos da flora 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, compostos reconhecidamente mutagênicos, pelas azoredutases dos micro-organismos intestinais (UMBUZEIRO et al., 2005).

Em geral, os corantes são considerados importantes contaminantes ambientais, estima-se que 1,2 toneladas de corantes sejam lançadas diariamente no meio ambiente, considerando apenas a indústria têxtil (GUARATINI; ZANONI, 2000). A cor interfere com a penetração da luz solar na água, retarda a fotossíntese e interfere na solubilidade dos gases nos corpos-d'água (COUTO, 2009). Além disso, esses compostos representam sérios riscos toxicológicos à flora, fauna e ao ser humano (GUARATINI; ZANONI, 2000).

A toxicidade aguda dos corantes não é relevante, aproximadamente 90% dos 4000 corantes avaliados pela ETAD (*Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments and Manufacturers*) apresentaram valores de DL₅₀ 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). Diante do exposto, a contaminação ambiental por corantes sintéticos representa um potencial risco de genotoxicidade.

Estudos demonstram que alguns corantes sintéticos são capazes de causar danos ao DNA, como relatado por Al-Sabti (2000); Umbuzeiro et al. (2005); Malachová et al. (2006); Yu An et al. (2007); Tsuboy et al. (2007); Chequer et al. (2009); Oliveira et al. (2010); e Ferraz et al. (2010). Apesar do número crescente de estudos envolvendo estes compostos, não existem na literatura dados suficientes para estimar o risco genotóxico da maioria dos corantes sintéticos utilizados atualmente.

1.2. Os corantes estudados

Neste trabalho, foi avaliado o potencial genotóxico dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5, sendo três pertencentes à classe dos azo corantes e um pertencente à classe antraquinona. A seguir é apresentada uma descrição de cada um dos compostos.

O corante Sudan III (FIGURA 1A) é um derivado fenil azóico largamente utilizado em indústrias químicas para coloração de materiais tais como: solventes, óleos, gorduras, plásticos, tintas, sapatos e ceras de polimento de chão, sendo também utilizado ilegalmente como adulterante de alimentos (STIBOROVÁ et al., 2002). Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) o corante Sudan III é classificado como pertencente ao grupo 3, ou seja, substâncias para as quais não existem evidências de indução de câncer (IARC, 1987; STIBOROVÁ et al., 2002). No entanto, o azo corante Sudan I (FIGURA 1B) possui estrutura semelhante ao Sudan III e, de acordo com a literatura, pode induzir câncer em ratos e coelhos além de ser capaz de formar adutos com o DNA (STIBOROVÁ et al., 2002).

Foram relatados resultados positivos para o Sudan I no teste de mutagenicidade com *Salmonella* para a linhagem TA1538 na presença de sistema de metabolização exógena (S9), indicando que esse corante dá origem a produtos mutagênicos após ser biotransformado pelo sistema citocromo P-450 (CAMERON et al., 1987; ZEIGER et al., 1988).

Yu An et al. (2007), avaliaram os efeitos genotóxicos induzidos pelo corante Sudan I em uma linhagem celular derivada de hepatoblastoma humano (células HepG2). Os autores verificaram um aumento na frequência de micronúcleos em todas as concentrações testadas (25 a 100 μ M), sugerindo que este corante é capaz de causar danos ao DNA de células HepG2.

FIGURA 1. Fórmulas estruturais dos corantes Sudan III (A) e Sudan I (B).

O corante Vat Green 3 (FIGURA 2) pertence à classe de corantes à cuba e possui em sua estrutura química a função antraquinona. Este composto é utilizado no tingimento de fibras têxteis de celulose e, por ser praticamente insolúvel em água é utilizado na forma leuco (forma líquida preparada em banho alcalino redutor) (FABER, 2010).

Por ser utilizado na forma leuco, altamente solúvel em água, esse corante pode facilmente atingir os ambientes aquáticos contaminando-os. Não há dados relatados na literatura sobre o potencial mutagênico do Vat Green 3.

FIGURA 2. Fórmula estrutural do corante Vat Green 3.

O corante Reactive Orange 16 (FIGURA 3) pertence à classe dos corantes reativos e possui em sua estrutura química a função azo. Este composto é utilizado no tingimento de fibras têxteis.

Malachová et al. (2006), verificaram que o corante Reactive Orange 16 é mutagênico para as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença de ativação metabólica exógena (S9), como também para a TA98 na ausência de S9, indicando que este corante age tanto como mutágeno direto quanto indireto. Adicionalmente, tal mutagenicidade ocorreu por dois mecanismos de ação: mutações por deslocamento do quadro de leitura do DNA e mutações por

substituição de pares de bases no DNA, ou seja, tipos de danos identificados pelas linhagens TA98 e TA100, respectivamente.

FIGURA 3. Fórmula estrutural do corante Reactive Orange 16.

O corante Reactive Black 5 (FIGURA 4) pertence à classe dos corantes reativos e possui em sua estrutura química duas ligações do tipo azo. Assim como os corantes Vat Green 3 e o Reactive Orange 16, este composto também é utilizado na indústria têxtil, sendo empregado no tingimento de fibras de nylon, seda, lã e algodão.

Malachová et al. (2006), constataram que o corante Reactive Black 5 é mutagênico para as linhagens YG1041 e YG1042 de *Salmonella typhimurium* na presença de ativação metabólica exógena (S9), indicando que este corante age como mutágeno, neste sistema teste, após ser metabolizado.

FIGURA 4. Fórmula estrutural do corante Reactive Black 5.

Apesar da extensa quantidade de corantes disponíveis no mercado, os estudos sobre a toxicidade desses compostos são escassos. Considerando que existem mais de 3.000 tipos de azo corantes disponíveis para os vários ramos industriais, 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; CERNIGLIA, 1992; HASHIMOTO; WATANABE; DEGAWA, 1977; UMBUZEIRO et al., 2005). Por exemplo, o 3-metoxi-4-aminoazobenzeno 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; WATANABE; DEGAWA, 1977). Assim, a atividade biológica dos corantes difere grandemente, apesar de apresentar similaridades em suas estruturas e, portanto, as propriedades toxicológicas destes corantes não podem ser generalizadas com referência a somente um grupo (AL-SABTI, 2000).

1.3. O Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese em células HepG2

A avaliação do potencial genotóxico dos corantes citados (Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5) foi realizada por meio do Ensaio de Micronúcleos utilizando as células HepG2 como sistema teste.

Mutação é uma alteração permanente do material genético, que pode ocorrer tanto em células somáticas quanto em células germinativas, sendo estas alterações chamadas de mutações somáticas e germinativas, respectivamente. As mutações somáticas não podem ser transmitidas à prole ao contrário das mutações germinativas que podem ser transmitidas a parte da prole ou a toda ela (GRIFFITHS et al., 1998). Estas alterações podem ser classificadas como gênicas ou cromossômicas:

- Na mutação gênica, ocorre alteração de um alelo de um gene, tornando-se um alelo diferente e, como tal alteração ocorre dentro de um único gene e está em um *locus* cromossômico (“ponto”), a mutação gênica também é chamada de mutação de ponto (GRIFFITHS et al., 1998);
- Na 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. Muitas destas alterações levam a anomalias de funcionamento da célula e do organismo. Existem dois motivos básicos para isso: primeiro, as mutações cromossômicas podem resultar em número ou posição anormal de genes; segundo, se a mutação cromossômica envolver quebra de cromossomos, o que em geral ocorre, a quebra pode ocorrer no meio de um gene, perturbando assim o seu funcionamento (GRIFFITHS et al., 1998).

O Ensaio de Micronúcleos é utilizado para detectar mutações cromossômicas que se manifestam sob a forma de micronúcleos. Um micronúcleo (MN) é definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal (FIGURA 5). 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 (FENECH, 1997; FENECH, 2000; FENECH, 2007).

Desta forma, a detecção de micronúcleos representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico, sendo considerados como mutações que são transmitidas às células, uma vez que 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. Consequentemente, a comparação da frequência 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).

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 frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir em sua cinética de divisão, mas também uma medida mais precisa da frequência 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). Atualmente vem sendo proposto o Ensaio Citoma de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese que, além de avaliar a indução de MNs, também avalia a formação de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, visando ampliar a detecção dos danos genéticos analisados (FENECH, 2007).

A Figura 5 mostra uma célula HepG2 binucleada contendo um MN e uma célula binucleada sem MN. Essas fotos foram obtidas durante a análise de MN induzidos pelos corantes avaliados.

FIGURA 5. (A) Foto de uma célula binucleada contendo um micronúcleo (indicado pela seta), (B) Foto de uma célula binucleada. Aumento de 400 vezes. Coloração com Giemsa.

Para a realização do Ensaio de Micronúcleos, 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).

As células HepG2 foram isoladas em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino. 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 tanto as atividades das enzimas de fase I, tais como isoformas do citocromo P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, como também as enzimas de fase II, incluindo glutathione-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuronosiltransferases, sendo que tais enzimas estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, as quais apresentam importante função na ativação e destoxificação de carcinógenos reativos de DNA (UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 1999; MAJER et al., 2004). Portanto, é aceitável que os ensaios com células HepG2 reflitam mais adequadamente os danos causados por mutágenos que os testes *in vitro* feitos com bactérias ou células de mamíferos, os quais requerem a adição de misturas de ativação exógenas para mimetizar o metabolismo de compostos de ação indireta (UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 2000; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

Dentro deste contexto, o Ensaio de Micronúcleos em células é de extrema relevância para Toxicologia Genética e Ambiental, tendo em vista que detecta mutações cromossômicas, podendo, portanto, ser considerado como marcador precoce para a carcinogênese, uma vez que este tipo de dano é encontrado em células de pacientes com câncer (BONASSI et al., 2007).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista que os corantes sintéticos são considerados importantes contaminantes ambientais e que, pouco se sabe a respeito da capacidade de cada uma dessas moléculas de causar danos ao DNA, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de induzir mutações de quatro corantes amplamente utilizados em diferentes ramos industriais. É importante salientar que os dados gerados neste trabalho irão fornecer subsídios tanto para o desenvolvimento de corantes mais seguros, quanto para a substituição por compostos menos tóxicos. Adicionalmente, os resultados deste trabalho são de extrema importância para a continuidade dos trabalhos de nosso grupo. Para atingir o objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Utilizar o Ensaio de Micronúcleos em células HepG2 para avaliar o potencial mutagênico do corante Sudan III;
- Utilizar o Ensaio de Micronúcleos em células HepG2 para avaliar o potencial mutagênico do corante Vat Green 3;
- Utilizar o Ensaio de Micronúcleos em células HepG2 para avaliar o potencial mutagênico do corante Reactive Black 5;
- Utilizar o Ensaio de Micronúcleos em células HepG2 para avaliar o potencial mutagênico do corante Reactive Orange 16;
- Avaliar se o tratamento das culturas, com diferentes concentrações dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Black 5 e Reactive Orange 16, interfere na proliferação das células HepG2 por meio da análise da proporção de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas para o cálculo do Índice de Divisão Nuclear (IDN).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. *Corantes estudados*

Algumas características dos corantes estudados neste trabalho estão descritas a seguir:

- **Sudan III** (FIGURA 1A)
 - ✓ Sinonímia: Scarlet B, Solvent Red 23, Sudan G.
 - ✓ Fórmula molecular: $C_{22}H_{16}N_4O$
 - ✓ Pureza: ~ 90%
 - ✓ Peso molecular: 352,39 g/mol
 - ✓ CAS: 85-86-9
 - ✓ Fornecedor: Sigma

- **Vat Green 3** (FIGURA 2)
 - ✓ Sinonímia: Indanthrene Olive Green B.
 - ✓ Fórmula molecular: $C_{31}H_{15}NO_3$
 - ✓ Peso molecular: 449,46 g/mol
 - ✓ CAS: 3271-76-9
 - ✓ Fornecedor: Dystar

- **Reactive Orange 16** (FIGURA 3)
 - ✓ Sinonímia: Remazol Brilliant Orange 3R.
 - ✓ Fórmula molecular: $C_{20}H_{17}N_3Na_2O_{11}S_3$
 - ✓ Pureza: ~ 50%
 - ✓ Peso molecular: 617,54 g/mol
 - ✓ CAS: 12225-83-1
 - ✓ Fornecedor: Sigma

- **Reactive Black 5** (FIGURA 4)
 - ✓ Sinonímia: Remazol Black B.
 - ✓ Fórmula molecular: $C_{26}H_{21}N_5Na_4O_{19}S_6$

- ✓ Pureza: ~ 55%
- ✓ Peso molecular: 991,82 g/mol
- ✓ CAS: 17095-24-8
- ✓ Fornecedor: Sigma

3.1.2. *Linhagem celular*

As células HepG2 utilizadas nos experimentos foram obtidas da American Type Culture Collection, Nº HB 8065.

3.1.3. *Soluções utilizadas*

➤ **Meio de Cultivo (incompleto)**

Foram dissolvidos 9,61 g de *Minimum Essential Medium* (MEM) em cerca de 500 mL de água Milli-Q. Foram acrescentados 2,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 10 mL da solução de antibiótico-antimicótico e 10 mL de piruvato de sódio. Depois, completou-se o volume para 1000 mL com água Milli-Q. O meio foi mantido sob agitação por 10 minutos para a completa dissolução e o pH foi corrigido para 7,2 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a 0,1 M. A esterilização foi realizada por filtração em membrana de 0,22 μm . O meio foi acondicionado em frasco estéril, rotulado (meio incompleto) e armazenado em geladeira.

➤ **Meio de cultivo (completo)**

Como os meios de cultivo não contêm substâncias mitogênicas torna-se necessária a adição desses estimulantes de divisão, tais como, o fator de crescimento presente no soro bovino fetal (SBF). Por esse motivo, antes de se iniciar o uso do meio de cultivo nas culturas de HepG2 adicionou-se o SBF numa proporção de 10% do volume total de meio.

➤ **PBS (Tampão fosfato) (1x)**

Pesou-se 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl) e 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4). Todos os sais foram dissolvidos em água deionizada, agitando até a completa solubilização, e completou-se o volume para 1000 mL.

Acertou-se o pH para 7,4 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a 0,1 M. A esterilização foi realizada por autoclavagem a 120°C por 30 minutos.

➤ **Tripsina-EDTA 0,1%**

A tripsina é uma enzima proteolítica utilizada no cultivo das células HepG2 para o desprendimento destas do frasco e, sua ação se dá por meio da degradação da matriz glicoproteica extracelular. Para prepará-la, misturou-se, na capela de fluxo, 10 mL de solução Tripsina-EDTA e 90 mL de PBS estéril em frasco estéril de 100 mL e armazenou-se em geladeira.

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

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

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

Foram adicionados 300 µL da solução mãe de citocalasina B (2 mg/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 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi preparada em água deionizada a 0,1%, no dia anterior ao seu uso. Essa solução foi conservada em geladeira, pois precisava estar gelada na hora de ser utilizada.

➤ **Fixador metanol - ácido acético 3:1**

O fixador foi preparado na proporção 3:1 (metanol - ácido acético glacial), 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 1000 mL. Agitou-se até a completa dissolução e o pH foi corrigido para 6,8 utilizando hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a 0,1 M. A solução foi conservada em geladeira. Este tampão foi utilizado na coloração das lâminas com Giemsa.

➤ **Solução Giemsa**

Em um frasco âmbar, 3 g de Giemsa foram misturados em 162 mL de glicerina e essa mistura foi colocada em banho-maria a 60°C *overnight*. Posteriormente, foram adicionados 252 mL 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 1:20 (Giemsa - tampão fosfato).

3.2. Métodos

3.2.1. O Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese em células HepG2

O Ensaio de Micronúcleos em células HepG2 foi realizado de acordo com o protocolo de Natarajan e Darroudi (1991) e Fenech (2007) com algumas modificações.

3.2.1.1. Protocolo para cultivo e manutenção da cultura de células HepG2

➤ *Descongelamento das células HepG2*

As células foram removidas do nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente. Logo após, foram transferidas para um tubo cônico estéril (tubo falcon) contendo 9,0 mL de meio de cultivo completo e centrifugadas por 5 minutos a 212 g (1500 rpm). O sobrenadante foi desprezado, ressuspendeu-se o pellet de células, adicionou-se 1 mL de meio completo e homogeneizou-se. Por último, as células foram transferidas para um frasco de cultura de 75 cm² contendo 14 mL de meio completo e então, foram encaminhadas para a estufa a 37°C com 5% de CO₂.

➤ *Repique e manutenção das células HepG2 para o Ensaio de Micronúcleos*

O meio de cultivo foi descartado e as células foram lavadas com 10,0 mL de PBS, a fim de remover totalmente o meio de cultivo que estava no frasco. Foram adicionados 5,0 mL de tripsina, homogeneizou-se e colocou-se o frasco deitado na estufa para que a tripsina entrasse em contato com toda a superfície celular. Após 3 minutos, foram dadas algumas batidas no frasco de cultura para que houvesse o desprendimento das células e depois, inativou-se a tripsina com 5,0 mL de meio de cultivo completo. O volume total do frasco de cultura foi transferido para um tubo cônico estéril de 15,0 mL, que foi centrifugado por 5 minutos a 212 g (1500 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspensionado com 1,0 mL de meio de cultivo. Para iniciar o Ensaio de Micronúcleos são necessárias $5,0 \times 10^5$ células HepG2 para cada frasco de cultura de 25 cm², portanto, realizou-se a contagem das células em câmara de *Newbauer*, com o objetivo de se estimar o volume apropriado de suspensão a ser distribuído para cada frasco.

3.2.1.2. Protocolo para a realização do Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio da citocinese em células HepG2

Após a contagem, adicionou-se o volume de suspensão celular correspondente a $5,0 \times 10^5$ células nos frascos de cultura de 25 cm², contendo 5,0 mL de meio de cultivo, que foram colocados na estufa a 37°C com 5% de CO₂, por 24 horas. Após 24 horas, foi feito o tratamento das culturas. No frasco correspondente ao controle positivo, foram colocados 20,0 µL de uma solução de benzopireno à 18,75 mg/mL, de forma que a concentração final no meio fosse de 75,0 µg/mL. Para os corantes Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 utilizou-se como controle positivo a cisplatina na concentração final de 0,05 µg/mL. Nos frascos correspondentes aos controles negativos foram colocados 50,0 µL de PBS (controle negativo dos corantes Vat. Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5) e 20,0 µL (0,4%) de DMSO (controle negativo do corante Sudan III). Os outros frascos foram tratados com as soluções dos corantes de modo a atingir concentrações finais no meio de 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µM (convertidos para 3,5; 8,7; 17,5; 26,2 e 35,0 µg/mL) para o corante Sudan III, 5,0; 7,5; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL para o corante Vat. Green 3, 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL para o corante Reactive Orange 16, e 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 µg/mL para o corante Reactive Black 5. Após o tratamento, todos os frascos foram novamente incubados a 37°C com 5% de CO₂.

por mais 20 horas. Após as 44 horas, o meio de cultivo de cada frasco foi desprezado e adicionou-se 5,0 mL de PBS a 37°C para lavar as células. Em seguida, o PBS foi descartado e foram colocados 5,0 mL de meio de cultivo em cada frasco. Após isso, foram adicionados 50 µL da solução de citocalasina B de uso, de forma que a concentração final no meio fosse de 3,0 µg/mL. Os frascos foram incubados por mais 28 horas e ao término das 72 horas totais procedeu-se a colheita e o teste de viabilidade celular.

➤ *Colheita para o Ensaio de Micronúcleos em células HepG2*

Os meios de cultivo de cada frasco foram retirados e colocados nos respectivos tubos de centrífuga identificados. Os frascos de cultura foram lavados duas vezes com 5,0 mL de PBS, sendo que a primeira lavagem foi reservada no tubo de centrífuga e a segunda lavagem foi descartada. Em cada frasco foram adicionados 1,5 mL de tripsina 0,1%, e estes foram colocados na estufa por 5 minutos para que ocorresse o desprendimento das células. A tripsina foi inativada pelo soro bovino fetal presente no meio reservado no tubo de centrífuga. Depois, utilizando uma pipeta de Pasteur, o meio foi homogeneizado e devolvido para os respectivos tubos de centrífuga, que foram centrifugados por 5 minutos a 212 g (1500 rpm). O sobrenadante foi retirado até restar aproximadamente 0,5 mL, adicionou-se 5,0 mL da solução de citrato gelada e homogeneizou-se os tubos durante 5 minutos. Logo após, adicionou-se 20,0 µL de formaldeído em cada tubo, homogeneizando-os imediatamente, novamente os frascos foram centrifugados a 212 g (1500 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado até restar aproximadamente 0,5 mL e foram adicionados 5,0 mL do fixador metanol/ácido acético, homogeneizando cada frasco imediatamente. Em seguida, foi feita uma centrifugação por 5 minutos 212 g (1500 rpm). A etapa de fixação foi repetida duas vezes. O fixador de cada frasco foi removido utilizando pipeta de Pasteur até restar quantidade suficiente para a confecção das lâminas (aproximadamente 0,5 mL).

➤ *Preparo das lâminas utilizadas no Ensaio de Micronúcleos*

Ambos os lados das lâminas foram lavados com Extran, enxaguados em água corrente e posteriormente em água destilada. Este procedimento foi repetido até que se observou a formação de um filme-d'água sobre as lâminas. As lâminas foram acondicionadas em frascos de vidro, devidamente limpos e contendo água destilada,

que foram armazenados em geladeira. Tanto a lavagem como a refrigeração das lâminas foram realizadas no dia anterior à colheita. Foram confeccionadas três lâminas para cada tratamento, e em cada lâmina foram colocadas duas gotas da suspensão de células. Após a secagem total, as lâminas foram coradas com Giemsa em tampão fosfato na proporção de 1:20, por 5 a 7 minutos.

➤ *Análise das lâminas*

As lâminas coradas foram analisadas em microscópio óptico, aumento de 400 ou 1000 vezes, e o número total de micronúcleos em 1000 células binucleadas (BN) viáveis foi avaliado para cada tratamento e controles. Além disso, foram contadas 500 células viáveis entre mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas (quatro ou mais núcleos) para o cálculo do Índice de Divisão Nuclear (IND) (FENECH, 2007) e da porcentagem de binucleadas (BN), que deve ser superior a 35% (FENECH, 2000). A viabilidade celular foi avaliada usando o teste de exclusão do corante Trypan Blue, utilizando pelo menos 80% de viabilidade para os testes.

3.2.2. Teste de exclusão do corante Trypan Blue

O teste de exclusão do corante Trypan Blue baseia-se no fato das células inviáveis, por não apresentarem membrana celular íntegra, serem permeáveis ao corante, ao passo que as células viáveis, cuja membrana está intacta, são impermeáveis 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 para o teste de exclusão do corante Trypan Blue*

Para avaliar a viabilidade celular dos tratamentos e dos controles por meio do teste do Trypan Blue foi feita uma diluição 1:1, ou seja, foram colocados 20 µL da suspensão de células em microtubos e foram adicionados 20 µL da solução do corante Trypan Blue a 0,25% em PBS, sendo estes homogeneizados. Uma câmara de *Newbauer* foi preenchida com estas soluções para se realizar a contagem de 100 células entre viáveis e não viáveis. As células foram contadas em microscópio

óptico, aumento de 100 vezes, e a porcentagem de células viáveis foi determinada para cada tratamento e controles. O critério para dar continuidade aos ensaios foi que o percentual de células viáveis fosse igual ou maior que 80% para todos os tratamentos e controles.

3.2.3. *Análise Estatística*

Os resultados do Ensaio de Micronúcleos foram estatisticamente avaliados por meio da análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.00[®]. As comparações foram feitas contra o controle negativo e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da substância utilizada como controle positivo

Inicialmente a substância escolhida para ser utilizada como controle positivo foi o benzopireno (B(a)P), um hidrocarboneto aromático policíclico classificado como um forte mutágeno e carcinógeno humano (IARC, 1987), e que está amplamente distribuído no ambiente (LAMY et al., 2008). Para exercer seus efeitos genotóxicos e/ou carcinogênicos, o B(a)P precisa ser ativado pelas monooxigenases do citocromo P-450 (CYP-450), a uma variedade de eletrófilos que podem se ligar covalentemente ao DNA (LAMY et al., 2008). Dessa forma, o B(a)P foi escolhido para ser utilizado como controle positivo neste experimento pela sua característica de exercer efeito mutagênico após a biotransformação.

A concentração de 75 µg/mL de B(a)P foi escolhida por ter demonstrado, anteriormente, bons resultados na indução de micronúcleos em células HepG2 (OLIVEIRA et al., 2010). No entanto, provavelmente devido a sua instabilidade físico-química ou a capacidade questionável de metabolização das células HepG2, este composto não demonstrou ser um bom controle positivo, ou seja, não induziu aumento significativo na formação de micronúcleos em relação ao controle negativos (FIGURAS 11 e 13). Diante disso, para os corantes Reactive Black 5 e Reactive Orange 16 o benzopireno foi substituído pela cisplatina (cDDP) que apresenta boa capacidade de induzir micronúcleos (KOSMIDER et al.2004).

A cisplatina é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como de testículo, ovário, mama e bexiga. No entanto, este composto apresenta efeitos colaterais como a genotoxicidade, que pode ser associada à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROs causam a oxidação de componentes celulares podendo levar à uma instabilidade genômica que, por sua vez, pode se resultar em um aumento na formação de micronúcleos (MENDONÇA et al., 2010). A concentração de 0,05 µg/mL foi escolhida por ter apresentado bom resultado na indução de micronúcleos em linfócitos humanos (CHEQUER, 2009), bem como em células HepG2 (OLIVEIRA et al., 2012).

Desta forma, para os primeiros corantes avaliados, Sudan III e Vat Green 3, o benzopireno foi utilizado como controle positivo dos experimentos (FIGURAS 11 e 13) e, para os corantes Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 a substância utilizada foi a cisplatina (FIGURAS 16 e 18).

4.2. Avaliação da viabilidade celular pela técnica de exclusão do corante Trypan Blue

A avaliação da viabilidade celular pela técnica de exclusão do corante Trypan Blue foi realizada 48 horas após as células HepG2 terem sido mantidas em contato com as soluções dos corantes avaliados. A finalidade deste teste foi apenas avaliar se a porcentagem de células viáveis era suficiente para prosseguir com os ensaios de mutagenicidade. Como mencionado anteriormente, 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). Devido à intensa coloração dos corantes, não foi possível utilizar o ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina).

A Figura 6 apresenta o resultado da análise da viabilidade celular, expresso em porcentagem de células viáveis, para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 3,5; 8,7; 17,5; 26,2 e 35,0 µg/mL do corante Sudan III.

FIGURA 6. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Sudan III. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com o solvente DMSO à 0,4%. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

A Figura 7 apresenta o resultado da análise da viabilidade celular, expresso em porcentagem de células viáveis, para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL do corante Vat. Green 3.

FIGURA 7. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Vat Green 3. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

A Figura 8 apresenta o resultado da análise da viabilidade celular, expresso em porcentagem de células viáveis, para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL do corante Reactive Orange 16.

FIGURA 8. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Reactive Orange 16. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

A Figura 9 apresenta o resultado da análise da viabilidade celular, expresso em porcentagem de células viáveis, para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ do corante Reactive Black 5.

FIGURA 9. Avaliação da viabilidade celular, pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue, das culturas de HepG2 tratadas com soluções do corante Reactive Black 5. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 μL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 $\mu\text{g/mL}$, utilizada como controle positivo. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes ($n=3$).

Como pode ser observado nas Figuras 6, 7, 8 e 9, não houve redução significativa na viabilidade celular de nenhuma cultura tratada com as soluções dos corantes avaliados em relação aos controles. Além disso, os resultados de viabilidade celular das culturas de HepG2 foram superiores a 80% em todos os tratamentos e controles, indicando que era possível dar prosseguimento aos ensaios.

4.3. Avaliação da mutagenicidade dos corantes estudados por meio do Ensaio de Micronúcleos em células HepG2

Neste trabalho, o Ensaio de Micronúcleos foi utilizado para avaliar o potencial mutagênico dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5. Como mencionado anteriormente, o sistema celular utilizado foram as células HepG2, consideradas ferramentas adequadas tanto para a análise de mutágenos diretos quanto indiretos (VALENTIN-SEVERIN, 2003).

Para cada corante estudado, o Ensaio de Micronúcleos foi realizado em triplicata e foram analisados os seguintes parâmetros: número total de MN em 1000 células binucleadas; porcentagem de binucleadas e proporção de células mononucleada, binucleada, trinucleada ou multinucleadas, que é utilizada para o cálculo do IDN (Índice de Divisão Nuclear).

O Índice de Divisão Nuclear (IDN) ou “Nuclear Division Index” (NDI) é calculado baseando-se no número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas encontradas no total de 500 células contadas por tratamento. Esse índice fornece uma medida do estado proliferativo das células viáveis, sendo assim, o menor valor possível de IDN é 1,0, o que ocorre quando todas as células não se dividiram ou não tiveram a citocinese bloqueada e, portanto, estão todas mononucleadas. Se todas as células completaram um ciclo de divisão e, portanto, estão todas binucleadas, o NDI será 2,0. O cálculo é feito de acordo com a expressão: $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$. Onde M1-M4 representam os números de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais núcleos, respectivamente, e N é o número total de células contadas (FENECH, 2007).

Segundo Fenech (2000), para a análise de micronúcleos, as culturas devem apresentar um percentual de células binucleadas (BN) acima de 35%. Para todos os tratamentos e controles, dos quatro corantes avaliados, o percentual de células binucleadas foi maior que 35%, portanto, todos os tratamentos puderam ser analisados. As tabelas contendo o resultado da análise da porcentagem de BN de cada corante encontram-se no Apêndice. Já o número de micronúcleos total e o IDN calculado para cada corante estão descritos a seguir.

4.3.1. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III

O IDN foi calculado para cada tratamento e controle. Pode-se observar que não houveram diferenças significativas no estado proliferativo das culturas de células HepG2 tratadas com as soluções do corante Sudan III em relação ao controle (FIGURA 10).

FIGURA 10. Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 3,5; 8,7; 17,5; 26,2 e 35,0 µg/mL do corante Sudan III. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com o solvente DMSO na concentração de 0,4%. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

A Figura 11 apresenta o número total de micronúcleos induzidos pelos controles e pelas soluções de Sudan III nas culturas de células HepG2. Os experimentos foram realizados em triplicata e a Figura 11 representa a média e o desvio padrão dos resultados.

FIGURA 11. Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 3,5; 8,7; 17,5; 26,2 e 35,0 µg/mL do corante Sudan III. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com o solvente DMSO na concentração de 0,4%. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

Pode-se notar que as concentrações avaliadas do corante Sudan III não induziram um aumento, estatisticamente significativo, no número total de micronúcleos em relação ao controle negativo, indicando assim que este corante não é capaz de induzir mutações cromossômicas no sistema celular avaliado, nas condições testadas.

Vale ressaltar que o corante Sudan III é estruturalmente semelhante ao corante Sudan I, um conhecido pró mutágeno. Yu An et al. (2007), avaliaram os efeitos genotóxicos induzidos pelo corante Sudan I em células HepG2. Os autores verificaram um aumento da migração do DNA, no Ensaio do Cometa, e um aumento na frequência de micronúcleos em todas as concentrações testadas (25 a 100 µM) e sugeriram que o mecanismo de ação genotóxica do Sudan I pode ocorrer de diversas maneiras, como pela formação de adutos com o DNA, pela quebra de fitas de DNA e pela quebra ou perda cromossômica. No entanto, esses efeitos genotóxicos parecem estar associados a danos oxidativos no DNA, provocados por espécies reativas de oxigênio.

Johnson et al. (2010), investigaram a capacidade do corante Sudan I de induzir danos cromossômicos em duas linhagens celulares que conservam atividade enzimática do CYP (AHH-1 e MCL-5). Com este estudo, os autores concluíram que os metabólitos oxidados do Sudan I foram mais clastogênicos que o composto principal.

Outro corante da classe dos Sudan, o Sudan IV, também teve seu potencial de induzir danos ao DNA de células HepG2 investigado. Foram realizados o Ensaio do Cometa, o Ensaio de Micronúcleos e também, o monitoramento intracelular da geração de espécies reativas de oxigênio. Os autores verificaram aumentos significativos da migração do DNA, no Ensaio do Cometa, na indução de micronúcleos, além de um aumento nos níveis de EROS intracelulares, provocados pelo corante em relação ao controle. Baseando-se nesses resultados, os autores concluíram que o corante Sudan IV exerce seus efeitos tóxicos por meio da formação de EROS que oxidam o DNA das células HepG2 (Zhang et al., 2009).

Apesar do resultado negativo, obtido neste experimento, não se pode inferir que este composto não tenha ação no material genético, tendo em vista que nosso grupo detectou respostas positivas para este mesmo corante no ensaio de Mutagenicidade com *Salmonella*, empregando a linhagem TA1535 na presença de ativação metabólica. Assim, podemos supor que o mecanismo de ação genotóxica principal deste composto seja mutação de ponto do tipo substituição de pares de base, efeito este detectado pela linhagem TA1535 (ZANONI, 2010).

Somando-se o fato de que o Sudan III somente foi positivo na presença de ativação metabólica (ZANONI, 2010), com a dúvida na capacidade de metabolização das HepG2 (considerando o resultado negativo para o B(a)P, que precisaria ser metabolizado pelas HepG2, no Ensaio de Micronúcleos), podemos inferir que este resultado negativo do Sudan III talvez possa ser alterado na presença de ativação metabólica. Diante disso, outros experimentos seriam necessários para se investigar o potencial deste corante de causar mutações.

4.3.2. Avaliação da mutagenicidade do corante Vat Green 3

O IDN foi calculado para cada tratamento e controle. Pode-se observar que não houveram diferenças significativas no estado proliferativo das culturas de células HepG2 tratadas com as soluções do corante Vat Green 3 em relação ao controle (FIGURA 12).

FIGURA 12. Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ do corante Vat Green 3. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 μL de PBS. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 $\mu\text{g/mL}$, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes ($n=3$).

A Figura 13 apresenta o número total de micronúcleos induzidos pelos controles e pelas soluções de Vat Green 3 nas culturas de células HepG2. Os experimentos foram realizados em triplicata e a Figura 13 representa a média e o desvio padrão dos resultados.

FIGURA 13. Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL do corante Vat Green 3. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. B(a)P refere-se ao benzopireno à 75 µg/mL, utilizado como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Pode-se notar que houve um aumento no número total de micronúcleos à medida que se aumentava a concentração do corante Vat Green 3. Este aumento foi observado até uma concentração limite (25,0 µg/mL), a partir da qual se pode observar uma redução no número de MN, o que pode indicar toxicidade celular causada por elevadas concentrações do corante testado, ainda que o IDN esteja normal. Esse fenômeno já foi detectado por nosso grupo para a mesma linhagem celular (CHEQUER et al., 2009). Outro aspecto que pode evidenciar toxicidade celular é que, nas concentrações elevadas, foi possível observar uma diminuição na quantidade de células presentes nas lâminas a serem lidas.

As concentrações de 10,0 e 25,0 µg/mL do corante Vat Green 3, induziram um aumento significativo e concentração-dependente no número total de micronúcleos em relação ao controle negativo. Diante disso, é possível inferir que este corante, contendo grupamento antraquinona, é capaz de causar mutações cromossômicas no sistema celular avaliado, nas condições testadas. A Figura 14

mostra a foto de uma célula HepG2 binucleada que expressou um micronúcleo após ser exposta ao corante Vat Green 3.

FIGURA 14. Foto de uma célula binucleada contendo um micronúcleo (indicado pela seta), obtida durante a análise de MN induzidos pelo corante Vat Green 3. Aumento de 400 vezes. Coloração com Giemsa.

Não existem dados na literatura especificamente sobre o potencial mutagênico deste corante, mas, alguns autores já demonstraram a toxicidade de outros corantes da classe antraquinona, como é o caso dos corantes Disperse Blue 3 e Remazol Brilliant Blue R. Malachová et al. (2006) avaliaram o potencial mutagênico destes corantes antraquinonas por meio do Ensaio de Mutagenicidade com *Salmonella*. Os autores verificaram respostas positivas para os dois corantes avaliados, sendo que o Disperse Blue 3 foi positivo para as linhagens TA 98, YG1041 e YG1042, na presença de ativação metabólica exógena, e o Remazol Brilliant Blue R foi positivo para a linhagem TA 98, também na presença de ativação metabólica exógena.

Os resultados obtidos deixam claro que, apesar de os azo corantes serem considerados a classe mais tóxica e, portanto, a mais estudada, dentre esses compostos, outras classes como as dos corantes com grupamento antraquinona (como é o caso do Vat. Green 3) necessitam também de terem suas toxicidades avaliadas.

4.3.3. Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Orange 16

O IDN foi calculado para cada tratamento e controle. Pode-se observar que não houveram diferenças significativas no estado proliferativo das culturas de células HepG2 tratadas com as soluções do corante Reactive Orange 16 em relação ao controle (FIGURA 15).

FIGURA 15. Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL do corante Reactive Orange 16. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

A Figura 16 apresenta o número total de micronúcleos induzidos pelos controles e pelas soluções de Reactive Orange 16 nas culturas de células HepG2. Os experimentos foram realizados em triplicata e a Figura 16 representa a média e o desvio padrão dos resultados.

FIGURA 16. Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL do corante Reactive Orange 16. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Pode-se notar que as concentrações avaliadas do corante Reactive Orange 16 não induziram um aumento, estatisticamente significativo, no número total de micronúcleos em relação ao controle negativo, indicando assim que este corante não é capaz de induzir mutações cromossômicas no sistema celular avaliado, nas condições testadas.

Apesar dos resultados negativos, não se pode inferir que este corante não tenha ação no material genético, uma vez que resultados de mutagenicidade positivos foram encontrados para o mesmo corante no Ensaio de Mutagenicidade com *Salmonella*. Malachová et al. (2006), verificaram que o corante Reactive Orange 16 é mutagênico para as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença de ativação metabólica exógena (S9), como também para a TA98 na ausência de S9, indicando que este corante age tanto como mutágeno direto quanto indireto. Adicionalmente, tal mutagenicidade ocorreu por dois mecanismos de ação: mutações por deslocamento do quadro de leitura do DNA e mutações por

substituição de pares de bases no DNA, ou seja, tipos de danos identificados pelas linhagens TA98 e TA100, respectivamente.

Além disso, trata-se de um azo corante e diversos estudos têm comprovado o potencial de induzir danos ao DNA apresentado por estes corantes. Rajaguru et al. (1999) investigaram o potencial mutagênico do azo corante Direct Red 2, amplamente utilizado na indústria têxtil, utilizando o Ensaio de Micronúcleos em medula de rato. Os autores concluíram que este corante é um potente agente clastogênico e que, portanto, a exposição excessiva a este composto pode representar riscos à saúde humana.

Tsuboy et al. (2007), analisaram os efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos do azo corante Disperse Blue 291 por meio do Ensaio de Micronúcleos em células HepG2 e Ensaio do Cometa. Os resultados obtidos mostraram que esse azo corante causou efeitos genotóxicos, induziu formação de MN, fragmentação de DNA e aumento do índice apoptótico nas células HepG2.

Chequer et al. (2009) também utilizaram o Ensaio de Micronúcleos em células HepG2 para avaliar a atividade mutagênica dos azo corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1. Segundo os autores, os dois corantes estudados aumentaram a frequência de micronúcleos nas células HepG2 com um efeito concentração-dependente, confirmando que os azo compostos constituem uma importante classe de mutágenos ambientais.

4.3.4. Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Black 5

O IDN foi calculado para cada tratamento e controle. Pode-se observar que não houveram diferenças significativas no estado proliferativo das culturas de células HepG2 tratadas com as soluções do corante Reactive Black 5 em relação ao controle (FIGURA 17).

FIGURA 17. Índice de Divisão Nuclear (IDN) calculado para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 µg/mL do corante Reactive Black 5. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 500 células e os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

A Figura 18 apresenta o número total de micronúcleos induzidos pelos controles e pelas soluções de Reactive Black 5 nas culturas de células HepG2. Os experimentos foram realizados em triplicata e a Figura 18 representa a média e o desvio padrão dos resultados.

FIGURA 18. Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 µg/mL do corante Reactive Black 5. O controle negativo, C (-), refere-se às culturas tratadas com 50 µL de PBS. cDDP refere-se a cisplatina à 0,05 µg/mL, utilizada como controle positivo. Em cada repetição foram analisadas 1000 células binucleadas e os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três repetições independentes (n=3).

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Pode-se notar que houve um efeito concentração-dependente no aumento do número de micronúcleos, ou seja, o número total de micronúcleos aumentou à medida que se aumentava a concentração do corante Reactive Black 5. Este aumento foi observado até uma concentração limite (0,5 µg/mL), a partir da qual se pode observar uma redução no número de MN, o que pode indicar toxicidade celular causada por elevadas concentrações do corante testado, ainda que o IDN esteja normal. Como dito anteriormente, esse fenômeno já foi detectado por nosso grupo para a mesma linhagem celular (CHEQUER et al., 2009). Outro aspecto que poderia evidenciar toxicidade celular é que, nas concentrações elevadas, foi possível observar uma diminuição na quantidade de células presentes nas lâminas a serem lidas. As concentrações de 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 µg/mL causaram um aumento significativo no número de micronúcleos em relação ao controle negativo, indicando que essas concentrações do corante testado são capazes de causar mutações cromossômicas em células HepG2.

O corante Reactive Black 5 já havia demonstrado atividade mutagênica para as linhagens YG1041 e YG1042 de *Salmonella typhimurium*, na presença de ativação metabólica exógena (S9), indicando que este corante age como mutágeno neste sistema teste após ser metabolizado (Malachová et al., 2006). Diante disso, pode-se afirmar que o corante avaliado é capaz de causar tanto mutações pontuais quanto mutações cromossômicas, nas condições testadas.

Outros corantes Reativos estudados também já demonstraram potencial genotóxico como é o caso do Reactive Red 120. Este corante Reativo foi avaliado por meio do teste com *Allium cepa* e as análises citogenéticas demonstraram fortes efeitos genotóxicos nas raízes de *A. cepa*. O corante também demonstrou genotoxicidade no Ensaio do Cometa (PHUGARE et al., 2011).

O corante Reactive Chlorotriazine Azo Red 120 foi avaliado por meio do Ensaio de Micronúcleos e mostrou-se mutagênico para eritrócitos de carpa Prussian (*Carassius auratus gibelio*). O autor além de demonstrar o potencial clastogênico deste corante Reativo, ainda sugeriu o uso do Ensaio de Micronúcleos em peixes como indicador da genotoxicidade de poluentes aquáticos (AL-SABTI, 2000).

Um aspecto que pode justificar o elevado potencial mutagênico demonstrado pelo corante Reactive Black 5 é o fato deste corante possuir em sua estrutura com dois grupamentos azo (FIGURA 4). Sabe-se que os azo corantes podem ser metabolizados pelas azoredutases dos micro-organismos intestinais em aminas aromáticas, compostos reconhecidamente mutagênicos, (UMBUZEIRO et al., 2005).

Frente ao exposto, os corantes sintéticos representam importante classe de contaminantes ambientais que podem diferir em suas ações tóxicas apesar da similaridade de estruturas. Portanto, estes compostos devem ser avaliados individualmente e por meio da utilização de diferentes *endpoints*, que abranjam os diversos mecanismos de ações tóxicas que estas substâncias possam apresentar.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- ✓ Dos quatro corantes estudados, dois (Vat Green 3 e Reactive Black 5) apresentam atividade mutagênica, dentro das condições testadas;
- ✓ O Reactive Black 5 apresenta maior potencial mutagênico que o corante Vat Green 3, uma vez que foi capaz de induzir mutações, no sistema celular avaliado, em concentrações menores;
- ✓ Os corantes Sudan III e Reactive Orange 16 não são capazes de induzir mutações cromossômicas nas células HepG2, dentro das condições testadas;
- ✓ De acordo com os IDNs calculados, nenhum dos corantes, nos diferentes tratamentos, foi capaz de interferir na proliferação das células HepG2. No entanto, foi possível observar uma diminuição no número de células nas lâminas.

6. REFERÊNCIAS*

AL-SABTI, K. Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 149-155, 2000.

ARSLAN, I.; BALCIOGLU, I.A.; TUHKANEM, T. Oxidative treatment of simulated dyehouse effluent by UV and near-UV light assisted Fenton's reagent. **Chemosphere**, v. 39, p. 2767-2783, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABQUIM), Brasília. Disponível em: < <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp> > Acesso em: 10 de Fevereiro de 2011.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCICI, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis Advance Access**, v. 28, p.625-631, 2007.

CAMERON, T.P.; HUGHES, T.J.; KIRBY, P.E.; FUNG, V.A.; DUNKEL, V.C. Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella/microsome and mouse lymphoma TK+/- assays. **Mutation Research**, v. 189, p. 223-261, 1987.

CHEMISTRY ENCYCLOPEDIA. **Dyes**. Disponível em: < <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp> > Acesso em: 13 de Janeiro de 2012.

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 the Intestinal Microflora. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 175-190, 1992.

COUTO, S.R. Dye removal by immobilized fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 227-235, 2009.

* Este trabalho foi escrito de acordo com as normas da ABNT propostas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FABER, M. **Tratamento fotocatalítico de corante ácido usando filmes finos de vidro/TiO₂ e degradação fotoeletrocatalítica de corante sobre eletrodos de filmes finos de Ti/TiO₂**: UNESP, 2010. 117 páginas. Tese (doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

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

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

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.

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 derivates of N-hidroxy-4-amino-azobenzenes and 4-nitroazobenzene. **Gann**, v. 68, p. 373-374, 1977.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Human**: Sudan III, v. 8, 1987. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>>. Acesso em: 10 de março de 2011.

JAMAL, F.; QIDWAI, T.; PANDEY, P.K.; SINGH, R.; SINGH, S. Azo and anthraquinone dye decolorization in relation to its molecular structure using soluble *Trichosanthes dioica* peroxidase supplemented with redox mediator. **Catalysis Communication**, v. 12, p. 1218-1223, 2011.

JOHNSON, G.E.; QUICK, E.L.; PARRY, E.M.; PARRY, J.M. Metabolic influences for mutation induction curves after exposure to Sudan-1 and para red. **Mutagenesis**, v. 25 (4), p. 327-333, 2010.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDEMAN, 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.

KOSMIDER, B.; WYSZYNSKA, K.; JANIK-SPIECHOWICZ, E.; OSIECKA, R.; ZYNER, E.; OCHOCKI, J. CIESIELSKA, E; WASOWICZ, W. Evaluation of the genotoxicity of cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, v. 558, p. 93-110, 2004.

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

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

MAJER, B.J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; WIT, K.; KANSMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p.153-166, 2004.

MALACHOVÁ, K.; PAVLÍCKOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; LEDNICKÁ, D.; MUSÍLKOVÁ, E. Reduction in the Mutagenicity of Synthetic Dyes by Successive Treatment with Activated Sludge and the Ligninolytic Fungus, *Irpex lacteus*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p.533-540, 2006.

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.

MENDONÇA, L.M.; SANTOS, G.C.; SANTOS, R.A.; TAKAHASHI, C.S.; MARIA DE LOURDES PIRES BIANCHI; M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. **Human and Experimental Toxicology**, v. 29 (8), p. 635-543, 2010.

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.

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

OLIVEIRA, G.A.R.; FERRAZ, E.R.A.; SOUZA, A.O.; LOURENÇO, R.A.; OLIVEIRA, D.P.; DORTA, D.J. Evaluation of the mutagenic activity of chrysin, a flavonoid inhibitor of the aromatization process. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 2012. No prelo.

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.

PHUGARE, S.S.; KALYANI, D.C.; PATIL, A.V.; JADHAV, J.P. Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 713-723, 2010.

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.

REVISTA ELETRÔNICA DE QUÍMICA (QMCWEB), Florianópolis (ano 4). **CORANTES: A Química nas Cores**. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>> Acesso em: 10 de Fevereiro de 2011.

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.

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.

SAHARAN, S.B.; RANGA, P. Optimization of cultural conditions for decolourization of textile azo dyes by *Bacillus Subtilis* spr42 under submerged fermentation. **Internacional Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 2, p. 148-153, 2011.

SMITH, G.J.; TE KANAWA, R. Some Traditional Colorants of Maori and other Cultures. **Chemistry in New Zeland Journal**, v. 72, p. 27-131, 2008.

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.

STIBOROVÁ, M.; MARTINEK, V.; RYDLOVÁ, H.; FREI, E. Sudan I is a Potential Carcinogen for Humans: Evidence for Its Metabolic Activation and Detoxication by Human Recombinant Cytochrome P450 1A1 and Liver Microsomes. **Cancer Research**, v. 62, p. 567-5684, 2002.

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

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; OLIVEIRA, D.P.; TERAQ, 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, 2005.

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.

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.

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.

WELHAM, A. The theory of dyeing (and the secret of life). **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v. 116, p. 140-143, 2000.

YU AN; JIANG, L.; CAO, J.; GENG, C.; ZHONG, L. Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 627, p. 164-170, 2007.

ZANONI, T. B. **Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e avaliação parcial dos corantes dispersos sudan III e disperso amarelo 9: USP**, 2010. 104 páginas. Dissertação (mestrado). Programa de Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

ZEIGER, E.; ANDERSEN, B.; HAWORTH, S.; LAWLOR, T.; MORTELMANS, K. Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 12, p. 1-158, 1988.

ZHANG, Y.; YU AN; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; JIANG, L.; ZHONG, L. The Role of Oxidative Stress in Sudan IV-Induced DNA Damage in Human Liver-Derived HepG2 Cells. **Environmental Toxicology**, DOI 10.1002/tox, 2009.

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

Apêndice

Resultados do Ensaio de MN em células HepG2 para o corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5.

TABELA 1. Média e desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições independentes do Ensaio de Micronúcleos para a análise da porcentagem de células binucleadas (% BN) e do Índice de Divisão Nuclear (IDN) em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Sudan III.

Tratamentos	% BN $\pm$ D.P.	IDN $\pm$ D.P.
Controle negativo (DMSO)	40,3 $\pm$ 4,16	1,63 $\pm$ 0,10
B(a)P (75 μ g/mL)	44,5 $\pm$ 5,14	1,59 $\pm$ 0,05
Sudan III (μg/mL)		
3,5	42,7 $\pm$ 4,84	1,64 $\pm$ 0,06
8,7	42,1 $\pm$ 3,20	1,59 $\pm$ 0,09
17,5	39,4 $\pm$ 2,96	1,53 $\pm$ 0,07
26,2	38,9 $\pm$ 3,11	1,51 $\pm$ 0,08
35,0	38,0 $\pm$ 1,59	1,53 $\pm$ 0,07

TABELA 2. Média e desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições independentes do Ensaio de Micronúcleos para a análise da porcentagem de células binucleadas (% BN) e do Índice de Divisão Nuclear (IDN) em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Vat Green 3.

Tratamentos	% BN $\pm$ D.P.	IDN $\pm$ D.P.
Controle negativo (PBS)	43,5 $\pm$ 3,41	1,61 $\pm$ 0,02
B(a)P (75 μ g/mL)	47,9 $\pm$ 1,14	1,63 $\pm$ 0,07
Vat Green 3 (μg/mL)		
5,0	45,1 $\pm$ 3,72	1,62 $\pm$ 0,05
7,5	43,9 $\pm$ 0,83	1,63 $\pm$ 0,06
10,0	45,7 $\pm$ 1,72	1,60 $\pm$ 0,06
25,0	43,8 $\pm$ 1,51	1,60 $\pm$ 0,06
50,0	47,5 $\pm$ 0,31	1,67 $\pm$ 0,10

TABELA 3. Média e desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições independentes do Ensaio de Micronúcleos para a análise da porcentagem de células binucleadas (% BN) e do Índice de Divisão Nuclear (IDN) em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Reactive Orange 16.

Tratamentos	% BN $\pm$ D.P.	IDN $\pm$ D.P.
Controle negativo (PBS)	45,3 $\pm$ 1,01	1,57 $\pm$ 0,01
cDDP (0,05 μ g/mL)	45,1 $\pm$ 2,21	1,56 $\pm$ 0,02
Reactive Orange 16 (μg/mL)		
0,5	44,5 $\pm$ 0,70	1,59 $\pm$ 0,03
1,0	44,6 $\pm$ 0,53	1,60 $\pm$ 0,07
2,5	45,1 $\pm$ 1,01	1,58 $\pm$ 0,04
5,0	45,3 $\pm$ 0,50	1,59 $\pm$ 0,03
10,0	45,3 $\pm$ 0,50	1,60 $\pm$ 0,04

TABELA 4. Média e desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições independentes do Ensaio de Micronúcleos para a análise da porcentagem de células binucleadas (% BN) e do Índice de Divisão Nuclear (IDN) em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Reactive Black 5.

Tratamentos	% BN $\pm$ D.P.	IDN $\pm$ D.P.
Controle negativo (PBS)	46,7 $\pm$ 3,06	1,56 $\pm$ 0,04
cDDP (0,05 μ g/mL)	45,4 $\pm$ 3,70	1,52 $\pm$ 0,03
Reactive Black 5 (μg/mL)		
0,05	44,1 $\pm$ 2,32	1,54 $\pm$ 0,06
0,10	45,8 $\pm$ 4,52	1,53 $\pm$ 0,04
0,25	45,3 $\pm$ 2,23	1,54 $\pm$ 0,05
0,50	44,9 $\pm$ 3,90	1,51 $\pm$ 0,04
1,00	43,5 $\pm$ 3,00	1,50 $\pm$ 0,05
2,50	45,3 $\pm$ 2,91	1,55 $\pm$ 0,04