UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatálise e cloração convencional na remoção dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas

Elisa Raquel Anastácio Ferraz

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatálise e cloração convencional na remoção dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Elisa Raquel Anastácio Ferraz

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Ribeirão Preto
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Anastácio Ferraz, Elisa Raquel
Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatálise e cloração convencional na remoção dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas, Ribeirão Preto, 2011.
158 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: Oliveira, Danielle Palma.

1. Disperse Orange 1 2. Disperse Red 1 3. Disperse Red 13 4.Fotoeletrocatálise 5. Cloração 6. Azo corantes 7. MTT 8. CCK-8 9. Monocamadas 10. 3D

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Elisa Raquel Anastácio Ferraz
Título do trabalho: Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatálise e cloração convencional na remoção dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas.

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedicatória

À minha eterna fonte de inspiração...meus pais!

Amo vocês!!!

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos e vitórias.

Ao meu pai, Hamilton, por nunca abandonar meus sonhos e sempre vivê-los comigo. À minha mãe Darcy, referência de vida, meu anjo, minha força, minha luz, por tudo que foi e continua sendo na minha vida.

Aos meus irmãos Julina, Darmilton, Hamilton e Magda por todo amor, e alegria que eles trazem à minha vida.

Ao meu querido noivo João Mário, pelo amor, paciência e cumplicidade.

Aos meus sobrinhos, Miguel, Grazielle, Bruna, Luíza, Stéphanie, Júlia, Ana Íris, João Ivo e Pablo pela torcida de sempre.

Aos meus cunhados, Regina, Valdir, Francisco e Eliécio pelo apoio.

Ao meu primo João e sua família pelo apoio e torcida de sempre.

À Aparecida e Cláudia, minhas queridas irmãs/mães, pelo companheirismo, carinho e fidelidade.

E, não menos importante, às minhas grandes amigas Farah e Lizziane, com quem compartilhei uma década de vida muito bem vivida.

À minha querida amiga Gisele pela amizade, companheirismo, e prestatividade de sempre.

Aos amigos Lidiane, Pedro, Roberto, Marcella Grando e Silvano pelo apoio, carinho e amizade.

Além do conhecimento, a ciência também é palco de grandes encontros. Durante esse tempo várias foram as amizades construídas, e que serão cultivadas pelo resto da vida...

À minha orientadora, Dra. Danielle, pelo incentivo e força de sempre, por todo conhecimento que me trouxe, de forma direta e indireta, pela compreensão, apoio e

pelo privilégio que me proporcionou em ser sua aluna. É uma profissional cuja competência e profissionalismo serão minha referência sempre.

À Dra. Gisela Umbuzeiro por toda atenção, pelas oportunidades e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Célia Rech pelo apoio, carinho e sobretudo amizade! É uma pessoa muito especial!

Aos amigos da CETESB – São Paulo: Simone, Wallace, Paulo, Daniela, pela receptividade, apoio e boa vontade em ajudar.

Aos amigos da CETESB – Ribeirão Preto especialmente à Maristela e Fátima por toda ajuda e atenção.

Aos colegas de laboratório, Eduardo, Thalita, Daniela e Eloísa pela atenção e apoio.

À Dra Juliana Falcão e aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica Bacteriana por toda contribuição.

Ao Laboratório de Bioquímica, especialmente à Ana Cristina pela paciência e toda ajuda prestada durante esse período.

Ao Laboratório de Parasitologia, especialmente ao Dr. Sérgio de Albuquerque pela disponibilidade e tolerância.

As excelentes profissionais e amigas AnaTuratti e Rosana Florêncio pela competência, profissionalismo e amizade construída durante esse período.

Ao Sr. Antônio e Clóvis, pela prestatividade de sempre.

À Dra. Jill Urban e toda a sua equipe pela recepção, oportunidade e aprendizado durante o doutorado sanduíche.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À FAPESP por financiar o projeto.

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

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso (...) Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.” (Dalai Lama)

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre”. (Albert Einstein)

RESUMO

ANASTÁCIO FERRAZ, E. R. **Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatálise e cloração convencional na remoção dos azo corantes, Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas.** 2011. 158f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Os azo corantes atualmente são considerados um assunto preocupante no que se refere à saúde pública e ambiental, pois quando lançados nos efluentes industriais contaminam o meio ambiente. Infelizmente, o método convencional de tratamento de efluentes têxteis, bem como de águas brutas que os recebem não são capazes de remover de maneira eficaz os corantes bem como sua toxicidade. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do tratamento de amostras aquosas por fotoeletrocatálise em comparação com a cloração convencional como método alternativo de degradação de azo corantes, usando os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 como modelo. Adicionalmente, foi avaliada a citotoxicidade dos corantes originais em condrócitos bovinos e células HepG2 em cultura em monocamadas e 3D. Para tanto, soluções desses corantes originais, clorados e fotoeletrocatalisados foram avaliadas utilizando ensaios de genotoxicidade/mutagenicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade. Todos os corantes originais e clorados foram genotóxicos para as células HepG2 no ensaio cometa. Para o ensaio com Salmonella, a cloração reduziu a mutagenicidade dos corantes para a linhagem YG1041 e aumentou o efeito para a linhagem TA98, exceto o Disperse Red 13 que teve a mutagenicidade reduzida para as duas linhagens após cloração. A fotoeletrocatálise removeu tanto a genotoxicidade quanto a mutagenicidade. Somente o Disperse Orange 1 induziu apoptose pelo ensaio com anexina V, mas essa citotoxicidade foi removida após os tratamentos. Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 foram tóxicos para *D. similis* enquanto somente o Disperse Red 1 foi tóxico para *V. fischeri*, sendo que os tratamentos por cloração e fotoeletrocatálise diminuíram a toxicidade apresentada. Os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 passaram a ser tóxicos para *V. fischeri* após cloração, sendo que a fotoeletrocatálise do Disperse Red 13 também gerou produtos tóxicos para esse organismo. Assim, embora seja um método de tratamento promissor, atenção deve ser dada na avaliação e aplicação da fotoeletrocatálise como um método alternativo à cloração. Os corantes originais Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 diminuíram a atividade mitocondrial dos condrócitos, sendo que o Disperse Red 13 também diminuiu a produção de lactato. Todos os corantes reduziram a atividade mitocondrial das células HepG2 em monocamadas, ao passo que o Disperse Orange 1 deixou de exercer esse efeito no cultivo em 3D. Somente o Disperse Red 13 diminuiu a atividade de desidrogenases das células HepG2 e tal efeito foi observado tanto no cultivo em monocamadas quanto em 3D.

Keywords: Disperse Orange 1, Disperse Red 1, Disperse Red 13, fotoeletrocatálise, cloração, azo corantes, MTT, lactato, CCK-8, monocamadas, 3D.

ABSTRACT

ANASTÁCIO FERRAZ, E. R. **Evaluation of the efficiency of the treatment with photoelectrocatalysis and conventional chlorination in the removal of the azo dyes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 and Disperse Red 13 from aqueous samples.** 2011. 158f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The azo dyes are currently considered as a concern regarding the environmental and public health, since when released in industrial effluents they pollute the environment. Unfortunately, the conventional method of treatment of textile effluents is not able to effectively remove both dyes and their toxicity. Within this context, this study aimed to evaluate the effectiveness of the treatment of aqueous samples by photoelectrocatalysis compared to conventional chlorination as an alternative method of degradation of azo dyes, using the dyes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 and Disperse Red 13 as a model. Additionally, we evaluated the cytotoxicity of the original dyes using HepG2 cells and chondrocytes cultured in monolayer and in 3D. To this end, solutions of these original dyes, chlorinated and photoelectrocatalysed were evaluated using tests of genotoxicity / mutagenicity, cytotoxicity and ecotoxicity. All the dyes, original and chlorinated, were genotoxic to HepG2 cells in the comet assay. For the test with Salmonella, chlorination reduced the mutagenicity of the dyes for the YG1041 strain and increased the effect for the TA98 strain, except Disperse Red 13, which had the mutagenic effect reduced for both strains after chlorination. The photoelectrocatalysis removed both genotoxicity and mutagenicity. Only Disperse Orange 1 induced apoptosis by annexin V assay, but this cytotoxicity was removed after treatment. The dye Disperse Red 1 and Disperse Red 13 were toxic to *D. similis* while only the Disperse Red 1 was toxic to *V. fischeri*, and the treatment by chlorination and photoelectrocatalysis decreased the toxicity showed. The dyes Disperse Orange 1 and Disperse Red 13 began toxic to *V. fischeri* after chlorination, and the photoelectrocatalysis of the Disperse Red 13 generated toxic products for this organism. So, while it is a promising treatment method, attention should be given in the evaluation and application of photoelectrocatalysis as an alternative to chlorination. The dyes Disperse Orange 1 and Disperse Red 13 decreased the mitochondrial activity of chondrocytes, and the dye Disperse Red 13 also decreased the production of lactate. All the dyes reduced the mitochondrial activity of the HepG2 cells cultured in monolayer, while the Disperse Orange 1 did no show this effect in 3D. Only Disperse Red 13 decreased the activity of dehydrogenases of HepG2 cells and this effect was observed both in monolayer and in 3D.

Keywords: Disperse Orange 1, Disperse Red 1, Disperse Red 13, photoelectrocatalysis, chlorination, azo dyes, MTT, lactate, CCK-8, monolayer, 3D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma estação de tratamento de efluente utilizando lodos ativados 8

Figura 2. Representação esquemática dos processos envolvidos na fotocatálise,..... 13

Figura 3. Reator fotoeletrocatalítico..... 14

Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura da superfície do filme de TiO_2 obtido de anodização..... 15

Figura 5. Fluxograma da resposta celular para os diferentes tipos de dano ao DNA 18

Figura 6. Esferas de alginato contendo condrócitos bovinos..... 25

Figura 7. Fotografia da perfusão contínua 27

Figura 8. Células HepG2 e condrócitos da articulação bovina dentro das esferas de alginato 28

Figura 9. Estrutura química dos azo corantes selecionados como modelo 35

Figura 10. Fotomicroscopia de fluorescência mostrando as células HepG2 com diferentes graus de danos no DNA 42

Figura 11. Gerador de esferas de alginato utilizado nos ensaios 60

Figura 12. Efeito do tratamento de cloração e fotoeletrocatálise na genotoxicidade dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13. 71

Figura 13. Resposta mutagênica do corante Disperse Orange 1 original e tratado para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência e presença de S9.. 72

Figura 14. Resposta mutagênica do corante Disperse Red 1 original e tratado para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência e presença de S9..... 73

Figura 15. Resposta mutagênica do corante Disperse Red 13 original e tratado para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência e presença de S9.. 74

Figura 16. Efeito do corante Disperse Orange 1 original nas viabilidade das células HepG2 com 24, 48 e 72 horas de incubação.. 75

Figura 17. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Orange 1 original e clorado com 72 horas de incubação..... 76

Figura 18. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Orange 1 original e fotoeletrocatalisado com 72 horas de incubação 76

Figura 19. Efeito do corante Disperse Red 1 original na viabilidade das células HepG2 com 24, 48 e 72 horas de incubação..... 77

Figura 20. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 1 original e clorado com 72 horas de incubação 78

Figura 21. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 1 original e fotoeletrocatalisado com 72 horas de incubação 78

Figura 22. Efeito do corante Disperse Red 13 original na viabilidade das células HepG2 com 24, 48 e 72 horas de incubação 79

Figura 23. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 13 original e clorado com 72 horas de incubação 80

Figura 24. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 13 original e fotoeletrocatalisado com 72 horas de incubação 80

Figura 25. Efeito dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 na atividade mitocondrial de condrócitos 84

Figura 26. Curva de calibração do padrão lactato e efeito dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 na produção de lactato pelos condrócitos 85

Figura 27. Viabilidade e número total de células HepG2 após 1, 4, 7, 11 e 14 dias de cultura em monocamadas, 3D em cultura estática e 3D em perfusão..... 87

Figura 28. Micrografia dos filamentos de F-actina formados no 7º dia de cultura das células HepG2 cultivadas em monocamada e em 3D..... 88

Figura 29. Efeito dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 na atividade mitocondrial de células HepG2 cultivadas em monocamadas e em 3D em cultura estática e em 3D em perfusão 89

Figura 30. Efeito dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 na atividade de desidrogenase de células HepG2 cultivadas em monocamadas e em 3D..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no teste Salmonella/microssoma empregadas no presente trabalho 21

Tabela 2 - Taxa de reversão espontânea em revertentes por placa esperada para as linhagens de *Salmonella typhimurium* usadas neste trabalho 49

Tabela 3 - Resultados do ensaio do cometa após exposição por 4 horas de células HepG2 ao corante Disperse Orange 1 original, clorado e fotoeletrocatalisado 66

Tabela 4 - Resultados do ensaio do cometa após exposição por 4 horas de células HepG2 ao corante Disperse Red 1 original, clorado e fotoeletrocatalisado 68

Tabela 5 - Resultados do ensaio do cometa após exposição por 4 horas de células HepG2 ao corante Disperse Red 13 original, clorado e fotoeletrocatalisado 70

Tabela 6 - Valores de EC50 gerados pelo programa Trimmed Spearman-Karber para os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 originais e tratados utilizando o ensaio com *Daphnia similis* 81

Tabela 7 - Valores de EC20 gerados pelo programa Microtox Omni para os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 originais e tratados utilizando o ensaio Microtox® 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZO	Benzo[a]pireno
CBPI	Cytokinesis block proliferation index
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
C.I.	Color index
COD	Chemical oxygen demand (demanda química de oxigênio)
DBPs	Disinfection by-products
ETA	Estação de tratamento de água
F-actina	Actina filamentosa
GHS	Globally Harmonization System of Classification and Labeling of Chemicals
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADP	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PBTA	2-fenilbenzotriazóis
PDMS	Polidimetilsiloxano
SABESP	Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo
SBMCTA	Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental
TOC	Total organic carbono (carbono orgânico total)
WST	Water soluble Tetrazolium salts

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas v
Lista de abreviaturas e siglas vi

1. INTRODUÇÃO 2
1.1 Os corantes têxteis e a contaminação ambiental 2
1.2 Os corantes têxteis 3
1.2.1 Classificação dos corantes 3
1.2.1.1 Os azo corantes 4
1.3 Tratamento de Sistemas Aquosos 7
1.3.1 Sistema de desinfecção convencional com cloro 10
1.3.2 Processos oxidativos avançados (POAs) 11
1.3.2.1 Fotocatálise heterogênea usando TiO_2 12
1.3.2.2 Fotoeletrocatálise usando TiO_2 como fotocatalisador 13
1.4 Ensaios toxicogenéticos, citotóxicos e ecototóxicos 15
1.4.1 Genotoxicidade e Mutações 16
1.4.2 Ensaio do cometa 18
1.4.3 Teste de mutagenicidade com Salmonella 19
1.5 Avaliação da citotoxicidade 22
1.5.1 Cultura de células em três dimensões (3D) 23
1.5.1.1 Cultura de células em perfusão 26
1.5.2 Células utilizadas 27
1.6 Avaliação da ecotoxicidade 29
1.6.1 Ensaio de toxicidade aguda utilizando Daphnia similis 29
1.6.2 Ensaio de toxicidade aguda utilizando Microtox® 30

2. OBJETIVOS 33

3. MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1 Material 35
3.1.1 Corantes estudados 35
3.2 Metodologia 36

3.2.1 Cloração convencional dos corantes 36
3.2.2 Fotoeletrocatálise dos corantes 36
3.2.3 Ensaio do cometa 37
3.2.3.1 Cultivo das células HepG2 38
3.2.3.2 Cultivo e manutenção da cultura das células HepG2 39
3.2.3.2.1 Descongelamento de células HepG2 39
3.2.3.2.2 Repique e Manutenção das células HepG2 39
3.2.3.2.3 Congelamento das células HepG2 40
3.2.3.2.4 Contagem das células para ensaios 40
3.2.3.3 Procedimento de ensaio 40
3.2.3.3.1 Método de exclusão por Trypan Blue 42
3.2.4 Ensaio de mutagenicidade com Salmonella 43
3.2.4.1 Meios de cultura e soluções 43
3.2.4.2 Preparo das culturas de uso rotineiro 47
3.2.4.3 Avaliação das características genéticas das linhagens 47
3.2.4.4 Procedimento de ensaio 49
3.2.4.4.1 Protocolo de pré-incubação 49
3.2.4.4.1.1 Avaliação da viabilidade 50
3.2.4.5 Esterilização 50
3.2.4.6 Lavagem de vidraria 50
3.2.5 Ensaio de citotoxicidade com anexina V 51
3.2.6 Ensaio de ecotoxicidade utilizando Daphnia similis 52
3.2.6.1 Soluções 53
3.2.6.2 Culturas das Daphnias 53
3.2.6.3 Carta-controle de sensibilidade 54
3.2.6.4 Procedimento de ensaio 54
3.2.7 Ensaio de ecotoxicidade Microtox® 54
3.2.7.1 Soluções 54
3.2.7.2 Procedimento de ensaio 55
3.2.8 Ensaios de citotoxicidade utilizando condrócitos da articulação bovina cultivados em monocamadas e em 3D 56
3.2.8.1 Soluções 56
3.2.8.2 Isolamento dos condrócitos – procedimento de ensaio 57
3.2.8.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT em condrócitos em monocamadas e em 3D 58
3.2.8.4 Ensaio do lactato em condrócitos em monocamadas e em 3D 59

3.2.9 Caracterização das células HepG2 em monocamadas e em 3D 59
3.2.9.1 Soluções.....59
3.2.9.2 Formação das esferas de alginato contendo células HepG2 60
3.2.9.3 Ensaios realizados para caracterização das células HepG2.....61
3.2.9.3.1 Viabilidade.....61
3.2.9.3.2 Morfologia – filamentos de F-actina.....61
3.2.10 Ensaios de citotoxicidade utilizando HepG2 em monocamadas e em 3D.....61
3.2.10.1 Soluções.....61
3.2.10.2 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT em células HepG2.....61
3.2.10.2.1 Formação dos esferoides.....62
3.2.10.2.2 Cultura em perfusão.....62
3.2.10.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando CCK-8 em células HepG2.....62
3.2.11 Análise estatística 63

4. RESULTADOS.....65
4.1 Avaliação da genotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o teste do cometa.....65
4.2 Avaliação da mutagenicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio Salmonella/microssoma.....72
4.3 Avaliação da citotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio com anexina V.....75
4.4 Avaliação da ecotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio com Daphnia similis.....81
4.5 Avaliação da ecotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio Microtox® 82
4.6 Avaliação da citotoxicidade dos corantes originais 83
4.6.1 Ensaio de MTT e lactato em condrócitos bovinos.....83
4.6.1.1 Ensaio de MTT.....83
4.6.1.2 Ensaio do lactato.....84
4.7 Caracterização das células HepG2 cultivadas em monocamadas, 3D em cultura estática e 3D em perfusão.....85
4.7.1 Viabilidade.....85
4.7.2 Morfologia –actina filamentosa (F-actina).....87
4.8 Avaliação da citotoxicidade dos corantes originais utilizando os ensaios MTT e CCK-8 em células HepG2 cultivadas em monocamadas e em 3D 88
4.8.1 Ensaio MTT.....88
4.8.2 Ensaio CCK-8.....90

5. DISCUSSÃO 93

5.1 Genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade dos corantes originais Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 93

5.2 Genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 após tratamento por cloração e fotoeletrocatálise 98

5.3 Cloração x fotoeletrocatálise 102

6. CONCLUSÕES 109

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112

APÊNDICES 129

APÊNDICE A - Dados brutos gerados no ensaio Salmonella/microssoma

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os corantes têxteis e a contaminação ambiental

A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna e a economia desse bem natural em processos produtivos vem ganhando especial atenção, uma vez que as previsões para os próximos anos da quantidade *per capita* de água são preocupantes. A Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (SABESP) estima que em um futuro próximo a demanda de água será superior à capacidade hídrica dos mananciais do estado (KUNZ et al., 2002, COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO [SABESP], 2009). Este problema ambiental está relacionado não só ao desperdício por mau uso desse recurso, mas também ao lançamento de efluentes industriais e domésticos.

Dentre as indústrias de alto poder poluidor, destacam-se as de tingimento das mais variadas fibras. A tintura de tecidos é uma arte que começou há milhares de anos e a disponibilidade comercial de corantes é enorme. Para atender à demanda do mercado consumidor em relação a cores e tons e a sua resistência, as empresas têxteis têm à sua disposição mais de 10.000 corantes, o que representa um consumo anual de cerca de 700.000 toneladas no mundo (RAJAGURU et al., 1999, GUARATINI, ZANONI, 2000), sendo 26.500 tons somente no Brasil (KUNZ et al., 2002).

A tecnologia moderna no tingimento consiste de várias etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil e as características dos corantes e pigmentos como: estrutura química, classificação, disponibilidade comercial, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras. Independente das características do(s) corante(s) escolhido(s), todo processo de tintura envolve como operação final uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes (GUARATINI, ZANONI, 2000). Nestes banhos, estima-se que aproximadamente 10 a 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos e alcançam o efluente industrial (RAJAGURU et al., 1999), contaminando o meio ambiente com cerca de um milhão de tonelada destes compostos (SHINTAKU, IMBROISI, SANTOS, 2006).

A principal fonte desta perda corresponde à incompleta fixação dos corantes durante a etapa de tingimento das fibras têxteis (GUARATINI, ZANONI, 2000).

Além do problema relacionado às perdas de corantes durante o processo de tingimento, ainda o setor têxtil apresenta um especial destaque dentro do contexto da poluição ambiental, devido a seu grande parque industrial instalado utilizar grandes volumes de água, gerando por consequência grandes volumes de efluentes (KUNZ et al., 2002). Para se ter uma idéia, sabe-se que aproximadamente 200 litros de água são necessários para cada quilograma de tecido de algodão fabricado (CARNEIRO et al., 2004). Estes efluentes são misturas complexas de muitos poluentes que varia de corantes originais perdidos durante os banhos de tingimento, até praguicidas e metais pesados associados (McMULLAN et al., 2001) e, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação de mananciais (KUNZ et al., 2002). Sendo assim, o que chega aos corpos d'água são efluentes com alta carga orgânica e demanda bioquímica de oxigênio, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, forte coloração e pouca biodegradabilidade. A poluição de corpos d'água com estes compostos provoca, além da poluição visual, alterações em ciclos biológicos da biota aquática, afetando principalmente processos de fotossíntese e oxigenação do corpo d'água, pois dificultam a passagem de luz solar pelas águas (PEREIRA, FREIRE, 2005).

Além deste fato, estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azo corantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (CHUNG, CERNIGLIA, 1992, HOUK, 1992, RAJAGURU et al., 1999, JAGER, HAFNER, SCHNEIDER, 2004, UMBUZEIRO et al., 2005a, UMBUZEIRO et al., 2005b), o que coloca em risco a saúde humana, uma vez que os sistemas de tratamento de efluente e as Estações de Tratamento de Água (ETAs) são ineficazes na remoção da coloração e mutagenicidade de alguns corantes (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004).

1.2 Os corantes têxteis

1.2.1 Classificação dos corantes

A molécula dos corantes se divide em grupo cromóforo, responsável pela cor, e a estrutura responsável pela fixação à fibra. Os corantes podem ser classificados de acordo com o grupamento cromóforo ou pelo seu uso ou método de aplicação,

sendo este o principal sistema adotado pelo *Colour Index* (CI). Dessa forma, de acordo com seu uso ou método de aplicação os corantes se dividem em: corantes reativos, corantes diretos, corantes à Cuba, corantes de enxofre, corantes básicos, corantes solventes, corantes ácidos e corantes dispersivos (OTHMER, 1993). Os corantes estudados neste trabalho são dispersivos com a função azo como grupo cromóforo, caracterizados como corantes orgânicos e que possuem ao menos uma ligação azo, apresentando boa fixação em fibras sintéticas (GUARATINI, ZANONI, 2000). Assim, será dada maior ênfase a esse grupo.

Os corantes dispersivos são corantes não iônicos insolúveis em água aplicados em fibras hidrofóbicas em dispersão aquosa. Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa (finamente dividido) sobre o acetato de celulose. O grau de solubilidade do corante deve ser pequeno, mas definido e influencia diretamente o processo e a qualidade da tintura. Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre este e a fibra hidrofóbica. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tinturas de fibras sintéticas, tais como: acetato celulose, *nylon*, *polyester* e poliacrilonitrila (OTHMER, 1993, GUARATINI, ZANONI, 2000).

1.2.1.1 Os azo corantes

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azo corantes, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos azo (-N=N-) ligados a sistemas aromáticos (KUNZ et al., 2002).

Mais da metade dos corantes produzidos anualmente pertence a esse grupo. Presumivelmente mais de 3000 diferentes azo corantes são usados para tingir vários materiais, sendo que a maior parte é empregada em tingimento de tecidos (STOLZ, 2001). Essa grande utilização se deve ao fato desses corantes permitirem um método de tingimento de fibras celulósicas (especificamente alongadas) com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade em relação às outras classes (GUARATINI, ZANONI, 2000).

Os azo corantes são compostos coloridos, insolúveis em água, que são realmente sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Nesse processo a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento (e.g. naftol) que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio (RN^{2+}) provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água (GUARATINI, ZANONI, 2000).

Toxicidade dos azo corantes

Vários estudos têm demonstrado que além da poluição visual - 10 a 50 mg/L de azo corantes solúveis já são capazes de tornar o corpo receptor altamente colorido - alguns azo corantes e seus produtos de biotransformação têm se mostrado tóxicos (BAE, FREEMAN, 2007).

Outro fato preocupante é a potencialidade de provocar dano ao material genético que alguns corantes desse grupo possuem. Estudos utilizando microorganismos e células de mamíferos têm demonstrado que vários azo corantes apresentam atividade mutagênica e genotóxica (AL-SABTI, 2000, JAGER, HAFNER, SCHNEIDER, 2004, WANG et al., 2005). Essa atividade está intimamente relacionada com a natureza e posição dos substituintes ligados ao grupo azo (CHUNG, CERNIGLIA, 1992). 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 et al., 1977). Como pequenas variações na molécula dos corantes alteram as suas propriedades genotóxicas, é importante que cada azo corante seja testado individualmente (UMBUZEIRO et al., 2005a). Chung e Cerniglia (1992) fizeram uma revisão sobre vários azo corantes já avaliados pelo ensaio *Salmonella*/microssoma, mostrando a importância da estrutura química na mutagenicidade dos azo corantes.

Além disso, aproximadamente 130 de 3200 azo corantes em uso produzem aminas aromáticas carcinogênicas após a clivagem redutiva da ligação azo (BAE, FREEMAN, 2007). No passado, azo corantes baseados em benzidina, 3,3'-diclorobenzidina, 3,3'-dimetilbenzidina e 3,3'-dimetoxibenzidina foram sintetizados em larga escala. Estudos em trabalhadores expostos demonstraram que ocorre azo-

redução desses corantes no homem, o que pode vir a explicar os casos de câncer de bexiga observados (GOLKA, KOPPS, MYSLA, 2004). A redução de azo corantes a aminas aromáticas pode ser catalisada por enzimas da fração microssomal do fígado e também por azoredutases produzidas pela microbiota intestinal (FRANCE, CARTER, JOSEPHY, 1986). Se eles são nitro-azo corantes, eles também podem ser metabolizados pelas nitroredutases produzidas pelos mesmos microorganismos ou por enzimas presentes no citoplasma de células de mamíferos, como as xantinas oxidases, ou ainda, pelo citocromo P450, daí a importância do uso da fração S9 nos testes de mutagenicidade com *Salmonella*, que será discutido posteriormente (NOVOTNY et al., 2006). Entretanto, tem sido mostrado que azoredutases e nitroredutases da microbiota intestinal desempenham um papel mais importante nesse tipo de metabolismo (SWEENEY et al., 1994, UMBUZEIRO et al., 2005a). Desta forma, o intestino delgado é um possível órgão alvo de carcinogênese pela exposição a azo corantes (SWEENEY et al., 1994). Em ambos os casos, se são formadas N-hidroxilaminas, elas são capazes de causar danos ao DNA.

Caso esses corantes sofram a ação da nitroredutase e O-acetiltransferase do fígado, as hidroxilaminas formadas podem ainda ser reduzidas a aminas aromáticas, e daí oxidadas pelas enzimas do citocromo P450 à N-hidroxiderivados. Estes podem ser acetilados por enzimas como O-acetiltransferase gerando íon nitrenium, capaz de reagir com o DNA e formar adutos (BARTSCH, 1981, ARLT et al., 2002). A geração de espécies reativas de oxigênio também parece estar envolvida na genotoxicidade de aminas O-hidroxi-aromáticas (SWEENEY et al., 1994).

Já os corantes que entram no organismo humano através do contato dérmico, poderão ser metabolizados a aminas aromáticas por bactérias presentes na pele (STAHLMANN et al., 2006).

Devido a esta toxicidade, os corantes que ao serem clivados geram benzidina foram proibidos pela Comunidade Européia (ECOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ASSOCIATION OF DYES AND ORGANIC PIGMENTS MANUFACTURERS [ETAD], 2002). Entretanto, a literatura especializada mostra que devido a problemas econômicos, países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não cessaram completamente a produção de alguns corantes à base de benzidinas (e.x. Congo Red 14) de grande potencialidade econômica (GUARATINI, ZANONI, 2000). Um estudo realizado recentemente no Brasil demonstrou a presença desta

amina aromática no efluente lançado por uma indústria de tingimento, demonstrando que este composto ainda faz parte dos processos industriais brasileiros (MAZZO et al., 2006).

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo, foi constatado que os azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 são mutagênicos para o ensaio de *Salmonella*/microssoma, utilizando as linhagens TA98, YG1041, TA100 e YG1042 (FERRAZ et al., 2010, FERRAZ et al., 2011). Tal mutagenicidade foi significativamente maior com as linhagens TA98 e YG1041, o que mostra que o principal mecanismo de ação mutagênica apresentado pelos três corantes é o deslocamento do quadro de leitura do DNA, tipo de dano identificado por essas linhagens. Além disso, a potência mutagênica com as linhagens superprodutoras de nitroredutase e O-acetiltransferase (YG1041 e YG1042) foi significativamente maior do que as respectivas linhagens que as originou (TA98 e TA100), o que mostra a importância da nitroredução e acetilação na ativação destes compostos (FERRAZ et al., 2010). Esses resultados foram confirmados utilizando o Teste de Micronúcleos em linfócitos humanos e em células HepG2 também realizado por nosso grupo (CHEQUER, 2008, CHEQUER et al., 2009). É importante salientar que estes corantes estão sendo largamente utilizados por indústrias de tingimento no Brasil e há poucas informações na literatura acerca dos mesmos.

1.3 Tratamento de Sistemas Aquosos

Em geral, na indústria têxtil os processos de tratamento de efluentes estão fundamentados na operação de sistemas físico-químicos de precipitação-coagulação, seguidos de tratamento biológico empregando sistemas de lodos ativados. Este processo consiste na agitação dos efluentes na presença de microorganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. Esta forma de tratamento apresenta como vantagem o baixo custo e a possibilidade de tratar grandes volumes de efluentes (KUNZ et al. 2002). Porém, este tratamento é bastante susceptível à composição do efluente, além de produzir um grande volume de lodo (SLOKAR, MARECHAL, 1998, KUNZ et al., 2002, FUKUNAGA, 2003, SABESP, 2009).

Antes de ser tratado, o efluente passa por grades para retirar os resíduos maiores e então é encaminhado para o filtro de areia e cascalho onde será filtrado.

Após este processo, o efluente passa para o decantador primário no qual ocorrerá a sedimentação de partículas mais pesadas. No tanque de aeração, próxima etapa do tratamento, o ar fornecido faz com que os microorganismos ali presentes multipliquem-se e alimentem-se de material orgânico formando o lodo. Parte do lodo depositado retorna ao tanque de aeração (por isso a designação de "lodo ativado") e a outra parte passa por um processo de secagem através de um leito de secagem ou filtro prensa. O lodo seco é acumulado em um reservatório e em seguida levado para ser incinerado. Do tanque de aeração o efluente vai para o decantador secundário, onde o lodo formado deposita-se no fundo (KUNZ et al., 2002).

A Figura 1 ilustra o esquema de tratamento por lodo ativado, tipicamente empregado para tratamento de efluente têxtil.

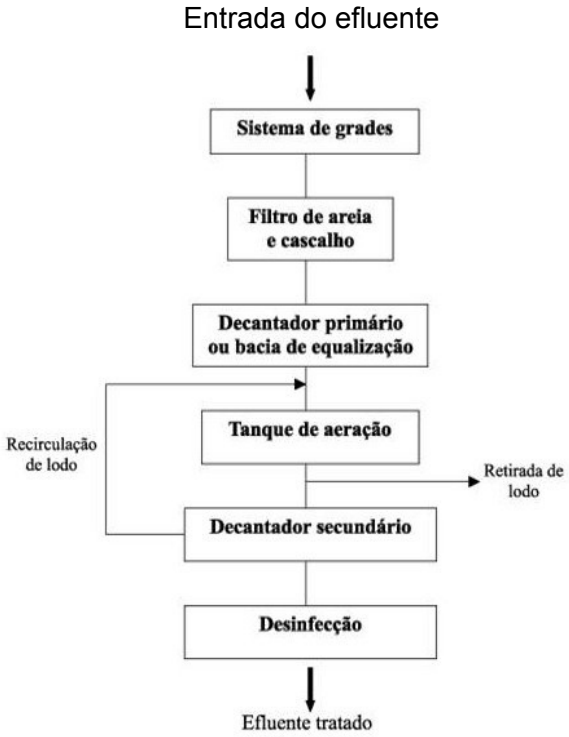


FIGURA 1. Representação esquemática de uma estação de tratamento de efluente utilizando lodos ativados (Fonte: KUNZ et al., 2002).

Porém, devido às já citadas exigências do mercado consumidor em relação à durabilidade das cores nas fibras, as moléculas dos corantes são extremamente estáveis e na maioria das vezes os microorganismos empregados no tratamento biológico não são capazes de metabolizá-las. Shaul et al. (1991) estudaram a eficácia do tratamento convencional de efluentes têxteis. Dos 18 azo corantes

estudados, 11 passaram através do processo de lodo ativo praticamente sem serem tratados, 4 (Acid Blue 113, Acid Red 151, Direct Violet 9 e Direct Violet 28) foram adsorvidos no lodo ativo e somente 3 (Acid Orange 7, Acid Orange 8 e Acid Red 88) foram biodegradados. Oliveira et al. (2007) analisaram o efluente de uma indústria de tingimento antes e após o tratamento. Os autores mostraram que o sistema de tratamento empregado não era eficaz na remoção total dos corantes nem tampouco da mutagenicidade detectada no efluente tratado lançado, contaminando a água bruta. Lima et al. (2007), observaram que ratos Wistar expostos a uma amostra de efluente coletado na mesma indústria estudada por Oliveira et. al., (2007) apresentaram aumento na incidência de criptas aberrantes no cólon, que é um biomarcador precoce de carcinogenicidade.

Devido à baixa eficácia do tratamento por lodos ativados, os efluentes continuam tendo coloração intensa após o tratamento. No Brasil, atualmente o padrão de lançamento de efluentes da Legislação Brasileira não estabelece valores numéricos para o parâmetro cor, porém determina que o despejo industrial não deva alterar a cor do corpo receptor (BRASIL, 2005). Assim, substâncias branqueadoras como hidrossulfito de sódio, ácido hipoclórico e, principalmente cloro são frequentemente adicionadas ao efluente com o intuito de desinfectar e remover ou reduzir a cor do mesmo, a fim de atender aos padrões de lançamento. Embora muito utilizada, essa prática de clorar os efluentes pode gerar compostos mutagênicos incolores, que podem contaminar tanto a água bruta quanto a tratada em casos de captação de águas contendo estes compostos, como já demonstrado por Oliveira et al. (2006) e discutido posteriormente neste trabalho.

Além dos inconvenientes deste tipo de tratamento no que diz respeito à remoção da cor e da toxicidade, os processos de tratamento convencionais com lodos ativados utilizados na indústria têxtil são não destrutivos, visto que eles só transferem compostos orgânicos da água para outra fase, causando poluição secundária (KUNZ et al., 2002, KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004). Consequentemente, é necessária a regeneração dos materiais adsorvidos e pós-tratamento dos resíduos sólidos, que são operações de alto custo.

Sabe-se que a qualidade da água tratada para abastecimento público está estreitamente relacionada com a qualidade da água bruta. Uma vez lançados em corpos d'água utilizados na captação de água para abastecimento, os corantes

atingem as ETAs, que também usam a cloração como método de tratamento e assim, não são capazes de removê-los de forma eficiente assim como seus produtos mutagênicos. Umbuzeiro et al., (2004, 2005b) em um estudo realizado no Ribeirão dos Cristais, região metropolitana de São Paulo, detectaram atividade mutagênica na água tratada fornecida para a população de Cajamar. Essa contaminação foi relacionada à presença de corantes na água bruta, ocasionada pelo lançamento de efluente mutagênico proveniente de uma indústria de tingimento, localizada a 6 km da captação da ETA (UMBUZEIRO et al., 2004). Seguindo os estudos de Umbuzeiro et al., (2004), Oliveira et al., (2006) detectaram a presença de corantes do tipo azo na água tratada fornecida à população. Os autores detectaram ainda substâncias mutagênicas incolores geradas após a etapa de cloração da água, supostamente semelhante aos 2-fenilbenzotriazóis (PBTAs). Estes são compostos genotóxicos formados a partir de azo corantes, utilizados principalmente em unidades de tingimento de produtos têxteis, e podem ser produzidos durante o próprio processo industrial, ou em estações municipais de tratamento de efluentes ou esgotos (KUMMROW, UMBUZEIRO, 2008, SHIOZAWA et al., 1999), conforme será discutido no item *1.3.1*.

O processo de cloração para desinfecção de água para o consumo humano possui um problema intrínseco, independente da contaminação de mananciais por corantes. Quando a água bruta captada rica em matérias húmicas e fúlvicas é clorada, produtos tóxicos e mutagênicos são gerados, os chamados produtos secundários de desinfecção ou *disinfection by-products* (DBPs) que são legislados pela Portaria n. 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). Alguns desses compostos são comprovadamente carcinogênicos para humanos e animais (BAYO, ANGOSTO, LÓPEZ, 2009). Embora trialometanos (THMs) e ácidos haloacético constituem as duas maiores classes de DBPs identificados em água, nos últimos 30 anos mais de 600 DBPs diferentes têm sido relatados na literatura (RICHARDSON et al., 2007).

1.3.1 Sistema de desinfecção convencional com cloro

Conforme citado anteriormente, a cloração de corantes é um problema ambiental. O método de oxidação química utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl) ou cloro gás, baseia-se no ataque eletrofílico ao grupo amino e subsequente clivagem

do grupamento cromóforo, que no caso dos corantes estudados no presente trabalho é a ligação azo (SLOKAR, MARECHAL, 1998). Segundo Slokar e Marechal (1998), o tratamento de corantes pertencentes ao grupo dos reativos através dessa metodologia requer um período de tempo maior, enquanto soluções de corantes com complexos metálicos (*metal-complex dyes*) permanecem parcialmente coloridas. Ainda, de acordo com os mesmos autores, os corantes dispersivos permanecem coloridos quando se usa o NaOCl.

Além disso, Shiozawa et al. (1999) demonstraram que a redução de azo corantes por hidrossulfito de sódio e sucessivas etapas de cloração com ácido hipoclórico podem formar benzotriazóis derivados do 2-fenilbenzotriazol (PBTA) e aminas aromáticas altamente mutagênicas, muitas vezes mais mutagênicas do que o corante de origem (SHIOZAWA et al. 1999). No meio ambiente aquático, esta etapa de redução dos corantes pode ocorrer em dois momentos: 1) Aplicação de agentes redutores na fibra recém-tingida para a retirada do excesso de corante não acoplado à fibra e que poderia levar ao “sangramento” dos tecidos no momento da lavagem. 2) Utilização dos agentes redutores como agente branqueador do efluente, visando atender à legislação. Esse efluente contendo os corantes reduzidos e sem cor, sendo enviado a uma estação de tratamento de esgoto municipal, que clora seus efluentes antes de liberá-los para os corpos d’água, poderá gerar os PBTAs. Vários PBTAs diferentes já estão descritos na literatura, e suas estruturas químicas variam de acordo com os corantes que os originou (SHIOZAWA et al. 1999, OLIVEIRA, 2005).

1.3.2 Processos oxidativos avançados (POAs)

Tendo em vista todos esses inconvenientes nos sistemas tradicionais de tratamento de efluentes, processos alternativos vêm sendo estudados na degradação dos corantes em sistemas aquosos nos últimos anos, com destaque aos processos oxidativos avançados (POAs).

POAs como reações catalíticas usando Fenton e foto-Fenton, processos utilizando H_2O_2/UV e fotocatálise mediada por TiO_2 têm sido estudados sob várias condições experimentais a fim de reduzir a cor e carga orgânica dos efluentes (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004).

A oxidação química tem como objetivo a mineralização dos contaminantes a dióxido de carbono, água e inorgânicos ou, pelo menos, a sua transformação em produtos menos prejudiciais (ANDREOZZI et al., 1999). Um dos principais agentes oxidantes é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Entretanto, este agente precisa ser ativado por alguns meios como, por exemplo, luz ultravioleta, ozônio, peroxidase entre outros, objetivando a formação de espécies reativas, responsáveis pela oxidação. Existem muitos métodos de descolorização química e estes variam de acordo com a forma na qual o H_2O_2 foi ativado (SLOKAR, MARECHAL, 1998, ROBINSON et al., 2001). Assim, os POAs consistem na geração de espécies muito reativas, como radicais hidroxila (•OH) a partir do H_2O_2, que oxidam uma variedade de poluentes de maneira rápida e não seletiva, característica esta muito importante para um oxidante usado no tratamento de efluentes e para a solução de problemas de poluição ambiental. Os radicais hidroxila são espécies extremamente reativas que atacam a maior parte das moléculas orgânicas de forma constante, geralmente na ordem de 10^6 – 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ (ANDREOZZI et al., 1999, FUKUNAGA, 2003).

1.3.2.1 Fotocatálise heterogênea usando TiO_2

Entre os POAs, a fotocatálise heterogênea usando TiO_2 como fotocatalisador aparece como a tecnologia destrutiva mais emergente. A vantagem-chave desse processo é sua natureza destrutiva inerente: não envolve transferência de massa, pode ser executado sob condições ambientais (oxigênio atmosférico é usado como oxidante), pode conduzir à completa mineralização do carbono orgânico em CO_2, não requer a adição de produtos químicos, não há geração de lodo e nem subprodutos tóxicos, além de promover a despoluição em curto espaço de tempo (FUKUNAGA, 2003, KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004). Além disso, TiO_2 é largamente disponível, barato, absorve radiação UV em comprimentos de onda < 380 nm, tem potencial redox da banda de valência adequado para catalisar diversas reações, é resistente à corrosão em ampla faixa de pH, não-tóxico e mostra alta estabilidade química (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004).

Embora as reações fotocatalíticas redox sobre superfícies semicondutoras apresentem particularidades, de um modo geral se processa segundo as etapas básicas de excitação com luz de energia maior que o *band gap* (E_g) (quantidade de energia necessária para que o semicondutor passe a conduzir corrente elétrica) do

semicondutor, geração de pares de elétron/lacuna (e-/h+); aprisionamento de elétrons e lacunas pelas espécies adsorvidas; reações redox entre espécies adsorvidas e cargas fotogeradas e dessorção dos produtos da reação redox e regeneração do semicondutor, conforme mostra a Figura 2 (ZIOLLI, JARDIM, 1998).

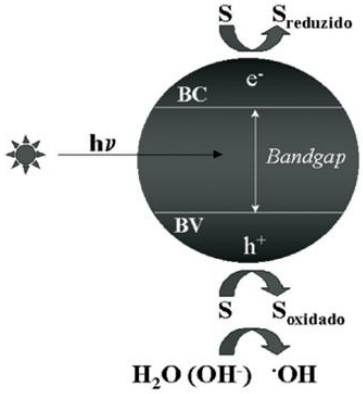


FIGURA 2. Representação esquemática dos processos envolvidos na fotocatálise, onde h*v* é a energia aplicada, S é a espécie adsorvida, BC é a banda de condução e BV a banda de valência (Fonte: TAUCHERT, ZAMORA, 2004).

1.3.2.2 Fotoeletrocatálise usando TiO_2 como fotocatalisador

A oxidação fotoeletrocatalítica é a combinação das tecnologias eletroquímicas e fotoquímicas e tem sido investigada como uma forma atrativa para aumentar a eficiência da fotocatálise na degradação de poluentes orgânicos (OSUGI et al., 2005). A vantagem da fotoeletrocatálise em relação à fotocatálise é a aplicação de um potencial através de um fotoeletrodo no qual o catalisador está apoiado. Essa configuração permite a separação mais efetiva das cargas geradas (e^-/h^+) deste processo, aumentando assim o tempo de vida dos pares elétrons-lacunas. Apesar dessa vantagem, poucos estudos têm sido conduzidos na aplicação dessa nova tecnologia para a degradação dos corantes têxteis (ZANONI, SENE, ANDERSON, 2003, OSUGI et al., 2005).

Comumente, esse processo é baseado na reação fotoquímica que acontece na superfície do TiO_2 sob um fóton incidente de luz UV com energia *hv*, responsável por criar um par de elétron. Sob um potencial positivo aplicado, o elétron é dirigido de forma mais eficaz para o contra eletrodo (rede de platina) enquanto a lacuna pode reagir com H_2O/OH para gerar um radical OH• com grande poder oxidante (CARNEIRO et al., 2005). Grupos de água adsorvida/OH estão disponíveis como doadores de elétron para o radical hidroxil (OH•) enquanto o oxigênio pode agir

como um aceptor de elétron para formar o íon radical superóxido (O_2•−). Ambas as espécies são fortemente oxidantes e capazes de degradar compostos aromáticos como corantes têxteis (CARNEIRO et al., 2004). A Figura 3 ilustra um reator fotoeletrocatalítico.

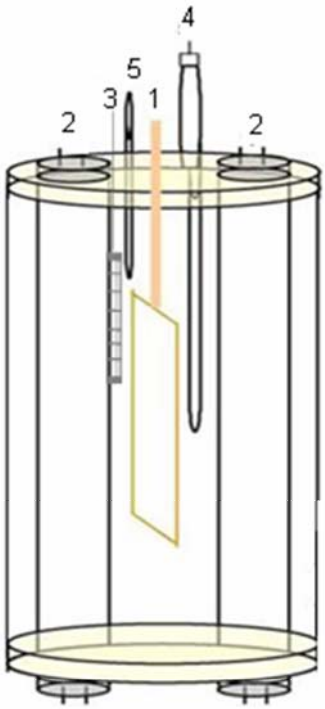


FIGURA 3: Reator fotoeletrocatalítico. Fotoanodo de Ti/TiO_2 preparado pelo método de sol–gel (eletrodo de trabalho) (1) iluminado por duas lâmpadas germicidas comerciais Phillips de 4Wcm^{-2} operando como fonte de luz UV (315–400 nm) montada a 5 cm em frente de cada lado do eletrodo de trabalho na célula (2). A rede de platina usada como contra eletrodo (3) e um eletrodo de referência colocado perto do eletrodo de trabalho (4). (5) Ar comprimido. A amostra fica dentro do reator, juntamente com o sal Na_2SO_4 dissociado, responsável pelo trânsito de elétrons (Fonte: modificado de OSUGI et. al., 2006).

A potencialidade da técnica de fotoeletrocatálise na oxidação fotoeletrocatalítica de corante reativo da família azo vem sendo investigado pelo grupo de eletroanalítica da UNESP de Araraquara com resultados bastante promissores (CARNEIRO et al., 2005, OSUGI et al., 2005). Os melhores resultados foram obtidos para o uso de fotoeletrodos construídos de titânio metálico recobertos com nanocamadas de TiO_2 (forma anatase) sob potencial controlado e luz ultravioleta. O dióxido de titânio é preparado pelo método sol-gel e revestido por uma variedade de suportes para produzir finos filmes de fotoeletrodo. Além da estabilidade eletroquímica, esses novos eletrodos têm grande área de superfície

interna, o que contribui para maior eficiência da descontaminação de poluentes orgânicos (CARNEIRO et al., 2005, OSUGI et al., 2005).

A Figura 4 mostra a micrografia eletrônica de varredura da superfície do filme de nanotubos de TiO_2.

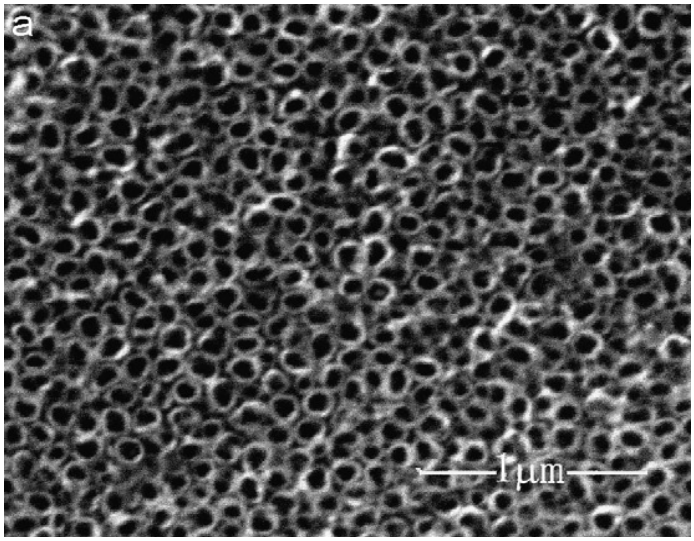


FIGURA 4. Micrografia eletrônica de varredura da superfície do filme de TiO_2 obtido de anodização (Fonte: LU et al., 2008).

1.4 Ensaios toxicogenéticos, citotóxicos e ecototóxicos

Tendo em vista todo o potencial tóxico dos azo corantes e a dificuldade de removê-los dos efluentes industriais pelo método de lodo ativo assim como a ineficiência da cloração na remoção destes compostos na produção de água tratada além da geração de compostos incolores desconhecidos, este trabalho avaliou a eficiência do tratamento por fotoeletrocatálise na degradação dos três azo corantes estudados pelo nosso grupo: Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13. A eficiência deste tratamento foi comparada com a cloração convencional simulando as condições das ETAs.

A fim de verificar a eficiência da fotoeletrocatálise comparada com a cloração convencional, a toxicidade genética dos produtos dos tratamentos foi avaliada pela detecção de diferentes tipos de dano ao DNA, utilizando o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* que detecta mutações de ponto e o ensaio do cometa que detecta quebra de fita de DNA. Por se tratar de uma estratégia nova de tratamento, é importante que outros *endpoints* além da mutagenicidade sejam avaliados. Por isso, este trabalho também avaliou a capacidade de indução de morte celular por

apoptose pelos corantes originais e tratados utilizando o ensaio Anexina V/PI em HepG2. Além disso, também foi avaliada a ecotoxicidade destes compostos utilizando os ensaios com *Daphnia similis* e Microtox®.

Adicionalmente, a citotoxicidade dos corantes originais Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 foi analisada utilizando os ensaios MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) e lactato em condrócitos bovinos em monocamadas e os ensaios MTT e CCK-8 (Cell Couting Kit -8) em HepG2 em monocamadas e em 3D. Essa parte do trabalho foi desenvolvida durante meu doutorado sanduíche realizado na Universidade de Oxford e na empresa Zyoxel LTDA em Oxford, Inglaterra. As amostras dos corantes clorados e fotoeletrocatalisados não puderam ser avaliadas durante esse período porque estas degradam após aproximadamente dois meses mesmo quando mantidas sobre refrigeração.

1.4.1 Genotoxicidade e Mutações

Uma substância é dita genotóxica quando tem a capacidade de reagir com o DNA diretamente ou após sua ativação metabólica, produzindo danos em sua estrutura e/ou função (WEISBURGER, 1999). Quando esses danos são transmitidos à descendência diz-se que ocorreu uma mutação (SANTELLI, 2003). As mutações fornecem a variação genética na qual a seleção da evolução opera (GRIFFITHS, et. al, 2001a). Porém, elas são responsáveis por várias doenças hereditárias humanas, entre elas o câncer (GRIFFITHS, et al., 1998a). Sua ocorrência se dá de maneira espontânea ou induzida por mutágenos (LEWIS, 2004).

Níveis em que ocorre uma mutação

Uma mutação pode ocorrer em dois níveis diferentes:

- Mutação cromossômica: segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros ou mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram (GRIFFITHS, et al., 1998a).
- Mutação gênica: os eventos mutacionais ocorrem dentro de genes individuais (GRIFFITHS, et al., 1998a). É também denominada de mutação de ponto, uma vez que as alterações ocorrem em pares de bases únicos do DNA ou num pequeno número de bases adjacentes (GRIFFITHS, et al., 2001b). O

ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, utilizado neste trabalho, detecta mutações de ponto. Assim, esta forma de mutação será mais detalhada a seguir.

Tipos de mutação de ponto

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

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

Baseado no exposto, quando acontece um dano no DNA, vários são os eventos que podem ocorrer, como ilustrado na Figura 5. Em células sob proliferação, será ativado o ciclo celular, conduzindo a um bloqueio no mesmo, o que fornecerá tempo para que o mecanismo de reparo seja ativado. Em células diferenciadas o sistema de reparo será ativado diretamente. Quando o reparo é completo, a célula poderá prosseguir o seu ciclo. Se o dano não puder ser reparado ou se houver muitas lesões no DNA, o ciclo celular poderá ser bloqueado permanentemente, conduzindo ao envelhecimento da célula ou induzindo apoptose. Se lesões não reparadas permanecerem sem serem detectadas, acarretará o aparecimento de mutações e instabilidade genômica, o que poderá conduzir à oncogênese (HOUTGRAAF, VERSMISSEN, GIESSEN, 2006).

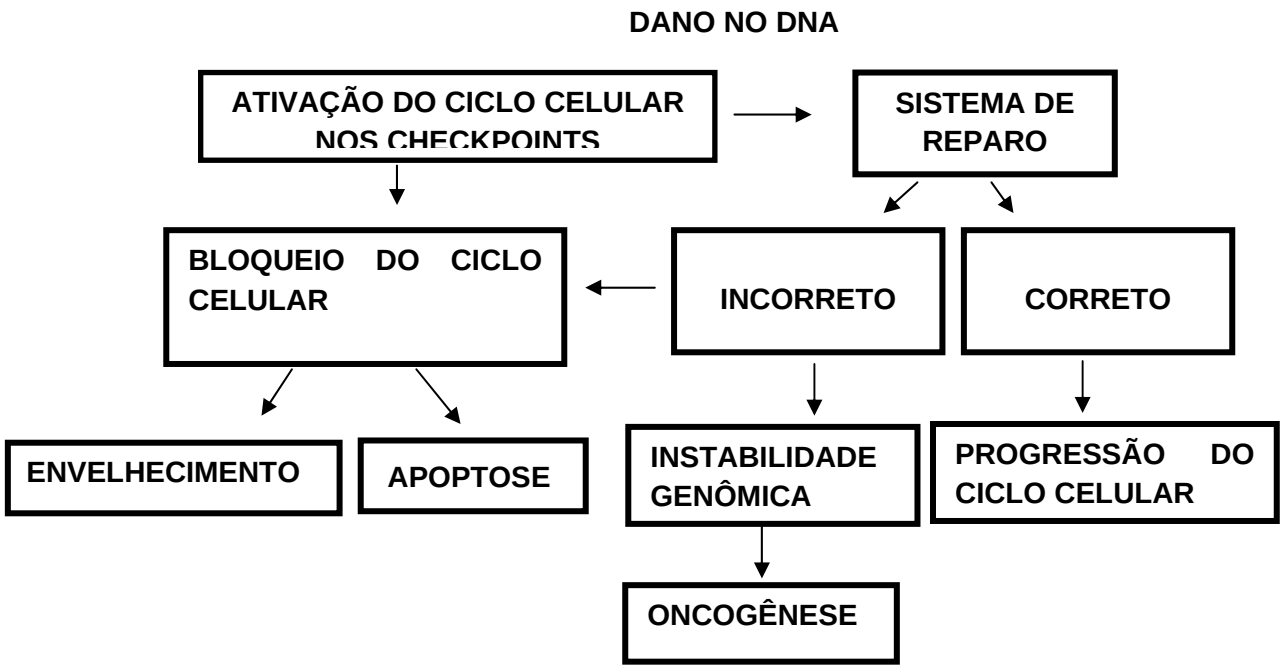


FIGURA 5. Fluxograma da resposta celular para os diferentes tipos de dano ao DNA (Fonte: HOUTGRAAF, VERSMISSEN, GIESSEN, 2006).

1.4.2 Ensaio do cometa

Nas últimas décadas, diversas metodologias para avaliação de danos ao DNA têm sido desenvolvidas e, dentre elas, o ensaio do cometa tem sido considerado como uma das mais eficientes ferramentas para tal finalidade. Este destaque é devido ao teste ser sensível, rápido e econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (KOSZ-VNENCHAK, ROKOSZ, 1997, SASAKI et al., 1997, MITCHELMORE, CHIPMAN, 1998). O ensaio não é empregado para detectar mutagenicidade, mas sim lesões genômicas (genotoxicidade) que, após serem processadas, podem se tornar mutações. Desta maneira, o ensaio do cometa tem sido indicado como um método apto a detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (GONTIJO, TICE, 2003, KOPPEN et al., 1999).

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros pesquisadores a desenvolverem uma metodologia capaz de mensurar danos no DNA em células individuais com a utilização da eletroforese em gel. Para o sucesso de tal técnica, os pesquisadores consideraram o comportamento da molécula de DNA em células individualizadas, bem como sua organização dentro do núcleo. Deste modo, as

células foram embebidas em agarose e dispostas em uma lâmina de microscopia, tendo as membranas lisadas por detergentes, as proteínas nucleares extraídas por altas concentrações de sais e, consequentemente, a liberação do DNA. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese sob condições neutras e os nucleóides migraram em direção ao anodo. As células com alta frequência de quebras no DNA apresentaram migrações em diferentes velocidades pelos diferentes fragmentos de DNA com diferentes tamanhos, gerando a aparência de uma cauda de cometa. Ao contrário, as células sem danos não apresentaram essas caudas e são chamadas nucleóides. Entretanto, esta técnica permite somente a detecção de quebra de fita dupla de DNA, o que limita o método (ROJAS, LOPES, VALVERDE, 1999). Em 1989 Singh e colaboradores inovaram este método, utilizando a eletroforese em pH alcalino (pH>13), o que tornou possível a detecção de quebra de fita simples e sítio álcali-lábeis, aumentando assim a sensibilidade do método, visto que quase todos os compostos genotóxicos induzem mais esses tipos de danos do que quebra de fita dupla de DNA. Hoje, conforme o pH da eletroforese, o teste do cometa pode detectar quebras de fita dupla e simples, ligações cruzadas, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos e excisão de sítios incompletos de reparo (TICE et al., 2000, GONTIJO, TICE, 2003, COLLINS, 2004).

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

1.4.3 Teste de mutagenicidade com Salmonella

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames ou Ensaio *Salmonella*/microssoma) (MARON, AMES, 1983) é um teste de curta duração utilizado para detectar substâncias que podem causar mutações de ponto. Está em uso por mais de 20 anos devido à sua alta sensibilidade (83%) e reconhecida validação (JARVIS, et al., 1996, KAPLAN et al., 2004). Além disso, é recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental para proteção da saúde humana e do meio ambiente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGÊNESE E TERATOGÊNESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004) e reconhecido por comunidades científicas, agências e corporações governamentais (MORTELMANS, ZEIGER,

2000). É usado mundialmente como um ensaio inicial para determinar a mutagenicidade de novas drogas e substâncias químicas porque há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

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

As linhagens de *Salmonella* usadas no teste sofrem mutações nos genes responsáveis pela biossíntese da histidina e como resultado não conseguem produzir esse aminoácido. Outra mutação é necessária para fornecer subsídios às células bacterianas e permitir que elas cresçam na ausência do referido aminoácido. Essa mutação ocorre quando as bactérias usadas são expostas a agentes mutagênicos (MARON, AMES, 1983).

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

Linhagens de Salmonella typhimurium

As linhagens de *Salmonella* usadas no ensaio pertencem ao grupo de Enterobactéria capazes de produzir azoredutase e nitroredutase, especialmente desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA (MARON, AMES, 1983, CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL [CETESB], 1997, UMBUZEIRO et al., 2005a).

Assim, o ensaio *Salmonella*/microssoma, apesar de ser um teste bacteriano, é uma ferramenta importante capaz de predizer os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria com características metabólicas similares à microbiota intestinal de mamíferos (OLIVEIRA, 2005, UMBUZEIRO et al., 2005a).

Outro fator importante é que as linhagens usadas podem reverter espontaneamente a auxotrofia para histidina (His^-) e assim podem crescer em um meio pobre no referido aminoácido. Esta é uma reversão espontânea relativamente fraca que pode ser aumentada através de mutações. Cada linhagem tem uma faixa característica de reversão espontânea. O aumento desta taxa permite avaliação da mutagenicidade das substâncias analisadas (MARON, AMES, 1983, MORTELMANS, ZEIGER, 2000, GAHYVA, JUNIOR, 2005).

As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos. A escolha de outras linhagens depende da disponibilidade e tipo da amostra, do foco do estudo e do conhecimento prévio do material a ser testado (CLAXTON et al., 1987, MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

A Tabela 1 mostra as características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste trabalho. A escolha dessas linhagens baseou-se em estudos anteriores realizados por nosso grupo, os quais demonstraram que estas são as mais sensíveis aos corantes aqui estudados (FERRAZ et al., 2010, FERRAZ et al., 2011).

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

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	*his*D3052[1], *rfa*[2], *Δbio*[3], *ΔuvrB*[4], pKM101 (Ap^r)[5]	Deslocamento do quadro de leitura	Maron e Ames (1983)
YG1041	*his*D3052[1], *rfa*[2], *Δbio*[3], *Δ uvrB*[4], pKM101 (Ap^r)[5], com alta produção de nitroredutase e O-acetiltransferase (pYG233) (Cn^r)[6]	Deslocamento do quadro de leitura	Umbuzeiro et al. (2005a) e Cerná et al. (1991)

[1] *his* mutação responsável pela síntese da histidina
[2] *rfa* permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos
[3] dependência à biotina
[4] Δ *uvr*B deleção do gene *uvr*B
[5] Ap^r ampicilina resistente

1.5 Avaliação da citotoxicidade

Citotoxicidade é a expressão de efeitos adversos na estrutura e/ou função de um ou mais componentes da célula. Segundo Ekwall (1983), a toxicidade exercida pela maioria dos compostos químicos é uma consequência de alterações não específicas nas funções celulares, o que pode afetar funções específicas de certos órgãos (EKWALL, 1983).

Muitos compostos químicos exercem seus efeitos tóxicos por interferirem nas estruturas ou funções celulares que são comuns a todos os tecidos (citotoxicidade basal) e/ou por afetarem estruturas ou funções de células específicas de um tecido (citotoxicidade tecido-específica) (GARLE, FENTEM, FRY, 1994). Vários são os mecanismos pelos quais os compostos citotóxicos podem causar danos às células, dentre eles pode-se citar: interferência na integridade das membranas e citoesqueleto, no metabolismo, na síntese e degradação ou liberação de constituintes ou produtos celular, na regulação de íon e na divisão celular (SEIBERT et al., 1996). Aqueles que afetam o metabolismo de energia celular, homeostase de Ca^{2+} e estado redox e finalmente causam necrose, podem também induzir apoptose (WYLLIE, 1997).

Apoptose é um processo normal no qual os organismos pluricelulares mantêm a homeostasia dos seus tecidos. Esse processo é também importante para a regulação do sistema imune e para a eliminação de células infectadas por patógenos (PIRET et al., 2004). A maioria das células de um organismo morre por apoptose (IGNEY, KRAMMER, 1999). Entretanto, anormalidades na regulação deste evento podem conduzir a patologias como doenças autoimunes, neurodegenerativas, AIDS e câncer (PIRET et al., 2004, ELMORE, 2007). A apoptose é um processo coordenado e dependente de energia que envolve a ativação de um grupo de cisteína proteases chamadas caspases e uma cascata complexa de eventos (ELMORE, 2007). É muito importante ressaltar que além de auxiliar nos estudos de citotoxicidade, a verificação de morte por apoptose é muito útil para avaliar a capacidade de uma célula fixar uma mutação. Assim, a deficiência da célula em sofrer apoptose contribui com a carcinogênese, uma vez que a supressão da apoptose pode desencadear a iniciação de tumores, além de sua progressão e metástase (LOWE, LIN, 2000). Dessa forma, é possível identificar

células pré-dispostas ao desenvolvimento do câncer quando expostas a agentes mutagênicos (EGUCHI et al., 1997).

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

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

Nos últimos anos pesquisas têm sido conduzidas no intuito de desenvolver e avaliar o uso de testes *in vitro* como pré-triagem e até mesmo substituição dos ensaios *in vivo* (EKWALL, 1983, PHILLIPS et al., 1990, SEIBERT et al., 1996).

Ensaios de citotoxicidade *in vitro* utilizam vários princípios diferentes. Podem-se citar os ensaios que utilizam marcadores de fluorescência para detectar substâncias liberadas das células que sofreram danos como o ensaio com anexina V, testes de determinação da viabilidade celular através da clivagem de sais tetrazolium como o MTT, ensaios que detectam a liberação de enzimas intracelulares, como a lactato desidrogenase (LDH) dentre vários outros (SCHAFER et al., 1997).

1.5.1 Cultura de células em três dimensões (3D)

A maioria dos testes usados para avaliar o metabolismo e toxicidade de fármacos e a toxicidade de xenobióticos utilizam modelos animais (*in vivo*) (ELKAYAM et al., 2006). Entretanto, testes em animais são caros, eticamente controversos e nem sempre prediz a resposta em humanos (PAMPALONI, STELZER, 2009). Assim, ensaios baseados no cultivo de células (*in vitro*) são considerados como uma boa alternativa (ELKAYAM et al., 2006, PAMPALONI, STELZER, 2009, LAN, MROCZKA, STARLY, 2010) .

Os testes *in vitro* convencionais geralmente usam o cultivo de células em monocamadas no qual as células crescem aderidas na superfície de frascos plásticos ou de vidro num sistema estático (CUI et al., 2007, PAMPALONI, STELZER, 2009, LAN, MROCZKA, STARLY, 2010). Entretanto, esse sistema de cultivo não reproduz a arquitetura do tecido *in vivo* nem prevê a toxicidade órgão-específica; além disso, a sinalização mecânica e bioquímica e a comunicação célula-célula são perdidas (MAZZOLENI, DI LORENZO, STEIMBERG, 2009, PAMPALONI, STELZER, 2009). Tais prejuízos podem ser atribuídos ao fato do cultivo em monocamadas oferecer às células um ambiente não fisiológico, forçando-as a se adaptarem em meio um artificial, plano e rígido (MAZZOLENI, DI LORENZO, STEIMBERG, 2009).

Em 1951 já se percebia limitações do cultivo em monocamadas, o que fez com que Leighton retomasse a idéia original de Carrel's (1912) acerca do cultivo de células em 3D e desenvolvesse melhorias (HOFFMAN, 1994). A partir daí várias foram as descobertas e melhorias envolvendo o cultivo de células em 3D (MOSCONA, 1957, INCH, MCCREDIE, SUTHERLAND, 1970, DURAND, BROWN, 1980, STEEG, ALLEY, GREVER, 1994, PAMPALONI, STELZER, 2009, LAN, MROCZKA, STARLY, 2010). Além disso, esforços têm sido feitos para aperfeiçoar esse tipo de cultura em ensaios toxicológicos, visto que estes permitirão predizer o efeito de toxicantes em humanos com maior precisão do que culturas em monocamadas (PAMPALONI, STELZER, 2009). Atualmente têm-se vários modelos de cultivo de células em 3D, dentre eles pode-se citar:

Culturas em 3D baseadas em hidrogel

Os tecidos dos organismos vivos são compostos de células e matriz extracelular (ECM) (colágenos, elastina, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, etc.) (SMETANA, 1993). A interação célula-célula e célula-matriz extracelular é feita através da sinalização bioquímica e mecânica. Tal interação estabelece uma rede de comunicação em 3D que mantém a especificidade e homeostasia do tecido (PAMPALONI, REYNAUD, STELZER, 2007).

Hidrogéis de matriz extracelular para cultura celular em 3D mimetizam as propriedades bioquímicas e mecânicas dos tecidos, o que confronta as células com um ambiente mais fisiológico do que quando em cultivo em monocamadas. Assim, a

relação entre a função celular e arquitetura do tecido pode ser isolada. Hidrogéis de matriz extracelular podem ser de origem animal, sintética ou ambos. Dentre eles pode-se citar colágeno tipo I, membrana basal reconstituída e alginato (PAMPALONI, STELZER, 2009). Nesse trabalho foi utilizado o gel de alginato, assim maior enfoque será dado a esse tipo de hidrogel.

Alginatos são materiais naturais derivados de algas marinhas e têm sido amplamente utilizados para mimetizar a estrutura da matriz extracelular em culturas celulares em 3D. Possuem propriedades que os tornam extremamente úteis como biomaterial base capaz de fornecer um microambiente favorável às funções e comportamento das células. São solúveis em água à temperatura ambiente e formam géis estáveis por *cross-linking* na presença de certos cátions divalentes como cálcio, bário e estrôncio (SMETANA, 1993), sendo que durante esse processo as células podem ser encapsuladas (LAN et al., 2010).

A Figura 6 mostra várias esferas de alginato contendo condrócitos bovinos utilizados nesse trabalho.

FIGURA 6. Esferas de alginato contendo condrócitos bovinos utilizados no presente trabalho.

Esferoides celulares

Esferoides celulares são grandes agregados de células formados pela aglomeração de células isoladas (KELM et al., 2003, PAMPALONI, STELZER, 2009). A sua formação se dá pelo cultivo de células em uma superfície não aderente, como em cápsulas de alginato em 3D, nas quais as células se aglomeram formando os esferoides, ou em frascos de cultura com rotação, ou através da técnica *hanging-drop*, onde gotas de meio de cultura contendo células isoladas são suspensas na tampa de uma placa de Petri e após 3 a 7 dias de crescimento os esferoides podem ser colhidos. Nas duas últimas técnicas as células se aglomeram através da gravidade (GLICKLIS et al., 2000, KHALIL et al., 2001, KELM et al., 2003, BILODEAU, MANTOVANI, 2006, PAMPALONI, STELZER, 2009).

Muitas linhagens celulares podem agregar em esferoides, incluindo MCF-10a, Caco-2 e HepG2 (KELM et al., 2003).

A diferenciação da cultura em esferoide inclui não somente a conservação da capacidade morfogênica e reorganização histotípica, mas também a manutenção das funções e padrões de expressão gênica (KELM et al., 2003).

Culturas organotípicas

As culturas organotípicas empregam pedaços do órgão a ser estudado, crescido *in vitro* sob condições de cultura de tecido. Culturas organotípicas de pulmão, pele e cérebro têm sido desenvolvidas e são amplamente usadas na descoberta de fármacos e em toxicologia (PAMPALONI, STELZER, 2009).

A principal vantagem de cultivar pedações de órgãos é que a arquitetura do órgão e a variabilidade interindividual são mantidas. A desvantagem é a necessidade de grande número de biópsias e a dificuldade de padronização dos ensaios (PAMPALONI, STELZER, 2009).

1.5.1.1 Cultura de células em perfusão

Segundo a literatura os três maiores métodos de cultivo de células são: estático (o mais comum), dinâmico (com agitação) e perfusão contínua, sendo que os dois últimos foram introduzidos recentemente e a perfusão contínua considerada o método mais promissor (BURG et al., 2000, BILODEAU, MANTOVANI, 2006).

Em uma cultura em perfusão contínua geralmente são empregados bioreatores. Nesse sistema, as células são suplementadas com o meio de cultura contendo os químicos a serem testados através de uma bomba com um fluxo contínuo e o meio utilizado é coletado, o qual poderá ser usado em ensaios de função metabólica e bioensaios (CUI et al., 2007). Os bioreatores utilizados nesse trabalho, registrados como Tissueflex® (Fig 7b), são feitos de polidimetilsiloxano (PDMS). A Figura 7a, tirada desse trabalho, ilustra o esquema de perfusão utilizada.

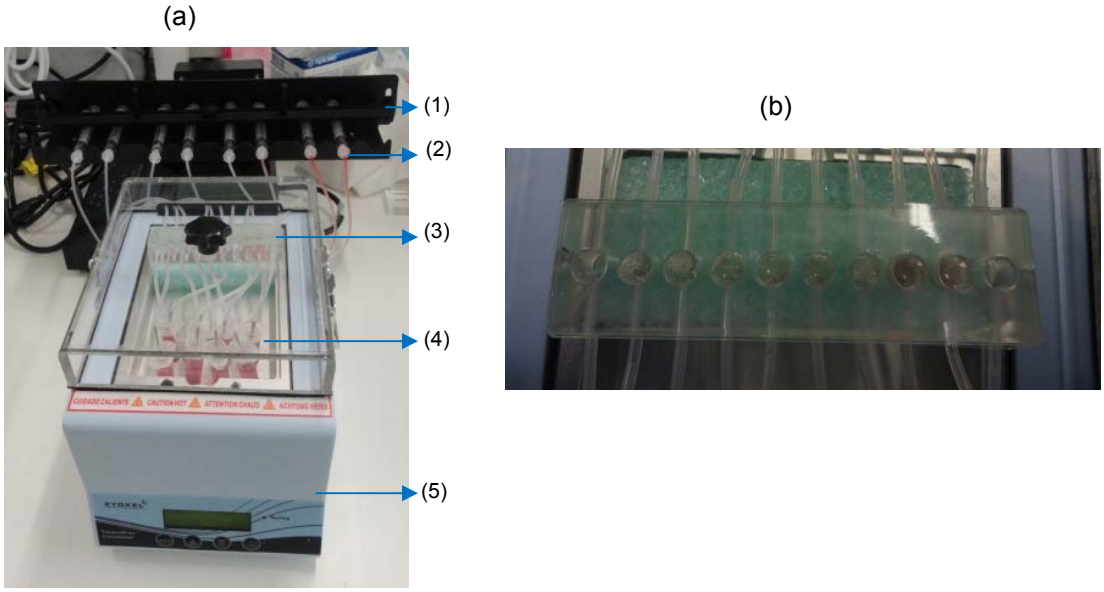


FIGURA 7. (a) Fotografia da perfusão contínua utilizada nesse trabalho: (1) bomba peristáltica, (2) seringas contendo o meio com os químicos a serem testados, (3) bioreator com 10 poços (microbioreatores) contendo células, (4) meio descartado, (5) incubadora. (b) Bioreator Tissueflex® com 10 microbioreatores.

Sabe-se que na cultura estática os nutrientes do meio são consumidos e os metabólitos são liberados na mesma solução, o que muda, com o passar do tempo, a composição do meio em contato com as células. Sendo assim, se este não for trocado regularmente, os nutrientes esgotarão e os metabólitos podem atingir níveis indesejados. Além do intenso trabalho e possível risco de contaminação, a principal desvantagem da cultura estática são as variações no ambiente onde se encontram as células, o que pode dificultar a determinação das reais condições da cultura e interpretação dos resultados (CUI et al., 2007).

Na cultura de células em perfusão essas limitações são superadas pelo fornecimento contínuo de nutrientes e substituição do meio dosado com a quantidade desejada do composto a ser testado. Além disso, o meio utilizado é descartado continuamente (SEIDEL et al., 2004).

1.5.2 Células utilizadas

HepG2

Neste trabalho foram utilizadas as células HepG2, isoladas por ADEN et al., em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino de 11 anos. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das

proteínas plasmáticas características das células normais de fígado humano, refletindo de forma satisfatória a biotransformação de pró-mutágenos (KNOWLES et al., 1980). Ainda, essas células mantêm as atividades das enzimas de fase I e II, que estão envolvidas na metabolização de genotoxicantes ambientais (UHL, HELMA, KNASMÜLLER, 2000). Além dos fatores acima mencionados, as células HepG2 foram escolhidas porque são derivadas de células humanas e, por isso, têm melhor correlação com possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos para o homem, o que facilita a extrapolação de resultados (KNASMÜLLER et al., 1998).

Condrócitos bovinos

Condrócitos são as células que compõem a cartilagem articular adulta. Estão embebidos em uma abundante matriz extracelular hidratada composta por colágenos (predominantemente tipo II com pequenas quantidades dos tipos VI, IX e XI), proteoglicanas (PGs) e pequenas quantidades de proteínas de matriz não colagenosas (HÄUSELMANN et al., 1994).

Partindo do princípio que o nosso objetivo foi fazer uma avaliação de risco à exposição a esses corantes e não há dados na literatura sobre a ação dos mesmos em cartilagem, escolhemos os condrócitos para esse fim. Além disso, ainda não havíamos estudado a ação desses corantes no metabolismo das células, o que viabilizou o uso dos condrócitos, uma vez que o lactato é o principal metabólito produzido por eles e o ensaio para medir os seus níveis é de fácil execução.

Neste trabalho foram utilizados condrócitos da articulação bovina em cultura primária.

A Figura 8 mostra células HepG2 (a) e condrócitos da articulação bovina (b) dentro de esferas de alginato.

(a) (b)

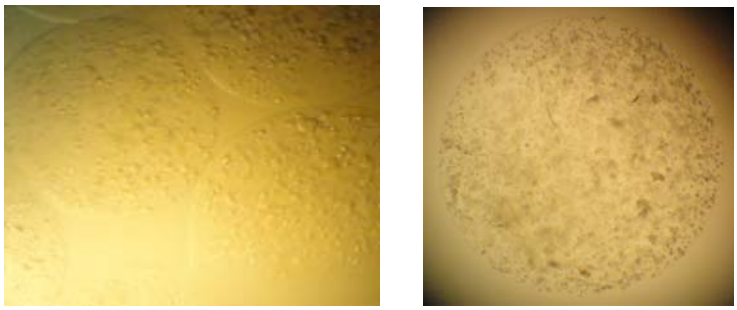


FIGURA 8. Células HepG2 (a) e condrócitos da articulação bovina (b) dentro das esferas de alginato (40x) utilizadas nesse trabalho.

1.6 Avaliação da ecotoxicidade

A ecotoxicidade determina o destino e efeitos de compostos químicos nos organismos que habitam corpos d'água, seu ecossistema e nos homens (PRITCHARD, 1993).

Estudos de toxicidade aguda e crônica em espécies aquáticas não documentam somente a susceptibilidade de espécies individuais a uma variedade de poluentes (MALINS, OSTRANDER, 1991), mas também servem para destacar um número de princípios fundamentais, como bioacumulação dentro de organismos individuais, biomagnificação na cadeia alimentar e a importância das propriedades físicas e químicas de cada agente na determinação da extensão dos dois processos (HAMELINK, SPACIE, 1977).

Há uma área adicional na qual os organismos aquáticos podem ser utilizados com grande relevância: como modelos para definir o mecanismo de ação tóxica de xenobióticos (PRITCHARD, 1993). Adicionalmente, o uso de uma grande variedade de espécies e modelos facilita a determinação de como vários agentes tóxicos, ou grupos de agentes exercem sua toxicidade (LEDERBERG, 1981).

1.6.1 Ensaio de toxicidade aguda utilizando Daphnia similis

O gênero *Daphnia* compreende microcustáceos extensivamente usados em testes para avaliar toxicidade aguda e crônica de agentes químicos e efluentes devido a sua alta sensibilidade a um grande número de contaminantes aquáticos. Além disso, sua importância na cadeia alimentar aquática, facilidade de cultivo em laboratório e reprodução partenogenética contribuem para o grande uso desses organismos em ensaios de toxicidade (BURATINI, BERTOLETTI, ZAGATTO, 2004).

Alguns procedimentos padrões utilizando esse gênero como organismo teste para ensaios ecotoxicológicos recomendam espécies temperadas como a *Daphnia magna* e *Daphnia pulex.* Entretanto, a utilização de outras espécies é possível, desde que sua sensibilidade seja maior ou igual às espécies indicadas. Assim, o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB introduziu outra espécie como um organismo teste, a *Daphnia similis*. Este organismo é fortemente relacionado com a *Daphnia magna*, pertencendo ao mesmo subgrupo do subgênero *Ctenodaphnia* (BURATINI, BERTOLETTI, ZAGATTO, 2004).

Daphnia similis já é recomendado com um organismo teste em ensaios ecotoxicológicos por normas padronizadas no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS [ABNT] 1993). Além disso, Buratini, Bertoletti e Zagatto (2004) fizeram um estudo comparando esta espécie com a *Daphnia magna*, o que confirmou a similaridade de comportamento desses dois organismos. Embora não seja uma espécie nativa, *Dapnhia similis* vem sendo muito utilizada em ensaios de toxicidade no Brasil embasando-se nas normas padronizadas pela ABNT (BEATRICI, 2001).

O ensaio de toxicidade aguda empregando *Daphnia similis,* assim como *Daphnia magna,* baseia-se na inibição da capacidade natatória dos organismos. O princípio do método é a exposição de indivíduos jovens por um período de 24 a 48 horas a várias diluições de uma amostra, após o qual é verificado o efeito de perda de mobilidade (ABNT, 1993).

O teste de toxicidade aguda empregando *Daphnia* é recomendado para a avaliação da qualidade de águas naturais onde houve mortandade de peixes e de efluentes líquidos que serão lançados em corpos d'água (ARAGÃO, ARAÚJO, 2006). Além disso, este é um teste mundialmente utilizado e normatizado, o que permite que os resultados possam ser comparados (*Organization for Economic Cooperation and Development* [OECD], 1997].

1.6.2 Ensaio de toxicidade aguda utilizando Microtox®

Microtox® é um teste de toxicidade aguda baseado na inibição de bioluminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri* NRRL B 11177. É uma marca registrada por Microbics Corporation e hoje é de propriedade da Strategic Diagnostic Inc. (GHIRARDINI et al., 2009).

Vibrio fischeri é uma enterobactéria, Gram negativa, pertencente à família Vibrionaceae, uma grande família consistindo em muitas espécies, que são caracterizadas pela cooperação e interação com tecidos de outros animais. *Vibrio fischeri* tem uma distribuição global, principalmente em águas temperadas e sub-tropicais onde ocupa uma variedade de nichos (JENNINGS, BRANDES, BIRD, 2001).

Bactérias luminescentes produzem luz quando oxidam simultaneamente riboflavina 5 – fosfato ($FMNH_2$) e um aldeído de cadeia longa (RCHO) na presença

de oxigênio. Durante a reação a molécula flavina se torna eletronicamente excitada e subsequentemente apresenta fluorescência com o retorno do elétron ao seu estado inicial, o que resulta na emissão de luz. A presença de um composto tóxico no meio altera ou inibe os processos, o que consequentemente reduz a produção de luz pelas bactérias (HARMEL, 2004).

A necessidade de baixa quantidade de amostra, importância ecológica, sensibilidade, reprodutibilidade, padronização e fácil execução fazem do Microtox® um teste amplamente aceito no mundo para monitoramento ambiental e atividades de triagem. Ele pode ser usado para testar amostras líquidas e sólidas na avaliação da toxicidade de um composto puro, no monitoramento de água superficial ou efluente, na avaliação de solo, sedimento e extratos orgânicos ou salinos (GHIRARDINI et al., 2009).

Diferentes concentrações de amostra são colocadas em contato com a bactéria marinha *Vibrio fischeri.* Se existe uma relação dose-resposta entre as concentrações da solução teste e a luz emitida, então a concentração que reduz a emissão de luz em relação ao controle é reportada. A análise da intensidade de luz é feita automaticamente por um programa de computador (BENNETT, CUBBAGE, 1992).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a avaliação da eficiência da fotoeletrocatálise, otimizada pelo grupo da Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, em Araraquara, SP, em comparação com a cloração convencional na degradação dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13.

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

- Avaliar a genotoxicidade dos corantes originais, empregando o ensaio do cometa;
- Tratar os corantes por fotoeletrocatálise e cloração convencional;
- Determinar a mutagenicidade e genotoxicidade de soluções dos corantes tratadas por cloração e fotoeletetrocatálise utilizando o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* e teste do cometa, respectivamente*;*
- Comparar os resultados obtidos com dados já gerados por nosso grupo em relação à mutagenicidade detectada com o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* (FERRAZ, 2010) e com os dados gerados com o ensaio do cometa;
- Avaliar a capacidade dos corantes em induzir apoptose antes e após os tratamentos utilizando células HepG2, por citometria de fluxo;
- Avaliar a ecotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando os testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e o ensaio Microtox®.
- Avaliar a citotoxicidade dos corantes originais em condrócitos bovinos cultivados em monocamadas e em 3D utilizando os ensaios de MTT e do lactato,
- Caracterizar as células HepG2 em monocamadas e 3D em cultura estática e em perfusão após 1, 4, 7 e 14 dias em cultura, tendo como *endpoints* a viabilidade e morfologia,
- Avaliar a citotoxicidade dos corantes originais em células HepG2 cultivadas em monocamadas e 3D em cultura estática, utilizando os ensaios MTT e CCK-8,
- Avaliar a citotoxicidade do corante Disperse Red 13 em células HepG2 em 3D mantidas em perfusão, utilizando o ensaio MTT.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Corantes estudados

Para avaliar a eficiência da fotoeletrocatálise em comparação com a cloração convencional, foram utilizados os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 como modelo. As estruturas químicas desses compostos originais estão mostradas na Figura 9.

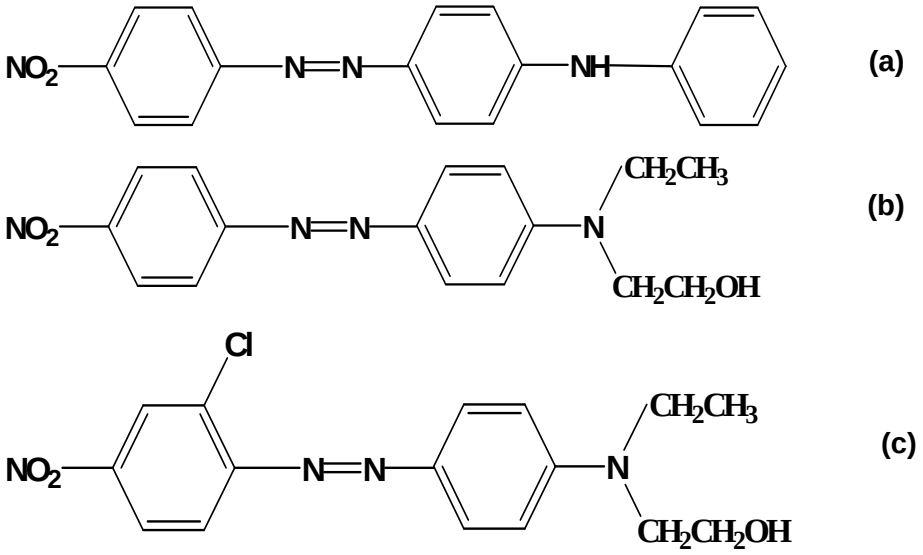


FIGURA 9. Estrutura química dos azo corantes selecionados como modelo: (a) Disperse Orange 1, (b) Disperse Red 1 e (c) Disperse Red 13.

Os corantes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e tratados no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), em Araraquara, SP, sob supervisão da professora Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

- Disperse Orange 1
  - ✓ Sinonímia: 4-(4—nitrofenilazo)difenilamina
  - ✓ Fórmula molecular: $C_{18}H_4N_4O_2$
  - ✓ Peso molecular: 318,33
  - ✓ Número CAS: 2581-69-3
- Disperse Red 1
  - ✓ Sinonímia: N-etil-N(2-hidroxietil)-4-(4-nitrofenilazo)anilina
  - ✓ Fórmula molecular: $C_{16}H_{18}N_4O_3$

- ✓ Peso molecular: 314,34
- ✓ Número CAS: 2872-52-8

- Disperse Red 13
  - ✓ Sinonímia: 2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino] etanol
  - ✓ Fórmula molecular: $ClC_{16}H_{18}N_4O_3$
  - ✓ Peso molecular: 348,78
  - ✓ Número CAS: 3180-81-2

3.2 Metodologia

3.2.1 Cloração convencional dos corantes

O processo de cloração convencional foi realizado através da passagem de gás cloro sobre amostras dos corantes, gerado a partir da reação de ácido clorídrico com permanganato de potássio, utilizando o equipamento de Kipp. A cloração foi realizada até a obtenção de cloro residual de 1,5 ppm, que é o valor preconizado pela Legislação Brasileira para águas tratadas (Brasil, 2005), simulando o tratamento empregado pelas Estações de Tratamento de Águas. O método utilizado já estava padronizado no laboratório da Dra. Valnice Boldrin Zanoni.

3.2.2 Fotoeletrocatálise dos corantes

Para os experimentos de fotoeletrocatálise o fotoanodo foi preparado segundo procedimento citado na literatura (ZANONI, SENE, ANDERSON, 2003). Placas de titânio foram recobertas com camadas de dióxido de titânio a partir de suspensão aquosa dialisada do óxido. As suspensões foram preparadas pelo processo sol-gel utilizando tetraisopropóxido de titânio. Após secagem ao ar, o eletrodo foi aquecido em atmosfera oxidante durante 5 horas. Os experimentos foram realizados em um reator contendo sistema de três eletrodos (catodo, anodo e referência) composto por placas de titânio (5 x 10 cm) com 0,5 mm de espessura recobertas com nanocamadas de TiO_2 (forma anatase) -Ti/TiO_2 ou dopado, como eletrodo de trabalho, uma rede de platina foi utilizada como contra eletrodo e um eletrodo de $Ag/AgCl_{(sat)}$ de junção dupla foi utilizado como eletrodo de referência. Fotoeletrólises a potencial controlado foram conduzidas em um potenciostato e o fotoanodo foi iluminado com luz ultravioleta. Os corantes foram colocados numa solução de Na_2SO_4 no reator fotoquímico.

3.2.3 Ensaio do cometa

Para o ensaio do cometa as concentrações foram escolhidas baseando no teste de micronúcleos em HepG2 realizado em nosso laboratório (dados não mostrados). Não foram utilizadas as mesmas concentrações do ensaio com *Salmonella* porque estas foram tóxicas para as células HepG2. Assim, foram utilizadas as concentrações: 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL e 4,0 µg/mL para cada corante original. As concentrações escolhidas para os corantes tratados basearam na resposta das células aos corantes originais. Sendo assim, para os corantes tratados foram escolhidas as concentrações: 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL e 4,0 µg/mL.

Preparo das lâminas e soluções

- Agarose normal 1,5% (preparo das lâminas)

  1,5 g de agarose normal foram misturados a 100 mL de PBS diluído (10 x). Essa solução foi levada ao forno de microondas por mais ou menos 1 minuto, até ficar translúcida e em seguida colocada no banho-maria a 60°C para estabilizar a temperatura. Então, as lâminas foram mergulhadas na solução de agarose e secas ao ar livre.
- Agarose LMP 0,5% (baixo ponto de fusão)

  500 mg de agarose LMP foram dissolvidos em 100 mL de PBS diluído (10 x) usando aquecimento em forno de microondas. Foram aliquotados 10 mL dessa solução em tubos cônicos (tubo falcon) e armazenadas na geladeira. No momento do uso, a solução de agarose foi derretida em microondas e colocada em banho-maria a 37°C até estabilizar a temperatura.
- Solução de lise (estoque)

  146,1 g de NaCl 2,5 M, 37,2 g de EDTA 100 mM e 1,2 g de Tris 10 mM foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada. Usando agitador magnético e NaOH o pH foi ajustado para 10. Essa solução foi conservada na geladeira por 1 mês.
- Solução de lise (uso)

  Essa solução foi preparada no momento do ensaio. 4 mL de Triton X-100 e 40 mL de DMSO foram dissolvidos em 356 mL de solução de lise estoque. Foram preparados 400 mL desta solução diretamente no *coppling.*

- Solução de EDTA 200 mmol/L (solução A)

  14,89 g de EDTA foram misturados em 200 mL de água destilada e o pH ajustado para 10 utilizando NaOH 10N. Essa solução foi conservada em geladeira por 2 semanas.
- Solução de NaOH 10 mol/L (solução B)

  Em banho de gelo, foram colocados 200 g de NaOH em 500 mL de água destilada. Essa solução foi preparada na capela de exaustão e conservada na geladeira ao abrigo da luz por 2 semanas.
- Solução de eletroforese (pH > 13)

  Essa solução foi preparada no momento do uso. 10 mL da solução A (EDTA) e 60 mL da solução B (NaOH) foram dissolvidos em 1930 mL de água destilada gelada.
- Solução tampão de neutralização (pH 7,5)

  48,5 g de Tris foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,5 utilizando HCl. Essa solução foi conservada na geladeira por 2 semanas.
- Solução de coloração - brometo de etídeo (20 µg/mL)

  1 mL da solução de brometo de etídeo 0,2 mg/mL foram diluídos em 9 mL de água destilada. Essa solução foi conservada à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

3.2.3.1 Cultivo das células HepG2

- Preparo do Meio de Cultura

  9,61g de *Minimum Essential Medium* (MEM- Gibco) foram dissolvidos em 500 mL de água destilada. 2,2 g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), foram acrescentados a 10 mL da solução de antibiótico-antimicótico (Gibco) e 10 mL de piruvato de sódio (Gibco) sendo completado o volume para 1 L com água destilada. O meio foi mantido sob agitação por 10 minutos para a completa dissolução e o pH corrigido para 7,2 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a usualmente 0,1 M. A esterilização foi realizada por filtração em membrana 0,22 µm. O meio foi então armazenado em frasco esterilizado na geladeira.

- Meio de cultivo: solução de uso

  Como os meios de cultivo não contêm substâncias mitogênicas, é necessária a adição de estimulantes de divisão, tais como o fator de crescimento presente no soro bovino fetal (SBF). Por esse motivo, antes de se iniciar o uso na cultura de células HepG2, foi adicionado SBF ao meio de cultivo numa proporção de 10%. Foi acrescentada também a mistura de antibiótico (0,1%), e 1% de piruvato de sódio.

- PBS

  Em balão volumétrico, foram dissolvidos 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) em água destilada q.s.p. 1000 mL, sendo agitados até a completa solubilização. O pH foi corrigido para 7,4 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a usualmente 0,1 M. E a esterilização foi realizada por autoclave a 120 °C por 30 minutos.

- Tripsina 0,1%

  Foram misturados, na capela de fluxo, 10 mL de tripsina e 90 mL de PBS estéril, em frasco estéril. Essa solução foi armazenada no congelador.

3.2.3.2 Cultivo e manutenção da cultura das células HepG2

3.2.3.2.1 Descongelamento de células HepG2

Primeiramente, as células foram removidas do nitrogênio líquido e descongeladas. Então, as mesmas foram transferidas para um tubo cônico estéril, no qual foram adicionados 9,0 mL de meio de cultivo (meio completo). Em seguida, as células foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a 212 g (1500 rpm), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspendido com 1 mL de meio de cultivo. As células foram transferidas para o frasco de cultura de 75 cm^2 contendo 14 mL de meio de cultivo e encaminhadas para a estufa a 37°C com 5% de CO_2.

3.2.3.2.2 Repique e Manutenção das células HepG2

O meio de cultivo foi descartado e as células lavadas uma vez com 10 mL de PBS (quando eram usados frascos de cultura de 150 cm^2 colocavam-se 15 mL de PBS e em frascos de 25 cm^2, colocavam-se 5,0 mL de PBS). Foram adicionados 5,0

mL de tripsina nos frascos de 75 cm^2 (em frascos de cultura de 25 cm^2 eram colocados 3,0 mL de tripsina, e em frascos de cultura de 150 cm^2, colocavam-se 10 mL de tripsina). A tripsina ficou em contato com as células na estufa a 37ºC por 3 minutos e então esta foi inativada com 5,0 mL de meio de cultivo completo em cada frasco de 75 cm^2 (para frascos de cultura de 25 cm^2 colocavam-se 3,0 mL de meio completo e em frascos de cultura de 150 cm^2 colocavam-se 10 mL de meio completo). Em seguida, toda essa solução foi transferida para um tubo cônico estéril e centrifugada a 212 g (1500 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido com 1,0 mL de meio completo. Em seguida, 0,5 mL da suspensão de células foram colocados em dois frascos de cultura de 75 cm^2 contendo 14,0 mL de meio completo em cada um. Os frascos foram colocados na estufa a 37ºC com 5 % de CO_2.

3.2.3.2.3 Congelamento das células HepG2

O procedimento utilizado foi o mesmo do repique. Entretanto, o *pellet* foi ressuspendido com 3 mL de solução DMSO + soro bovino fetal (10 mL de DMSO + 90 mL de SBF). O conteúdo do tubo foi dividido para 3 tubos criogênicos (1 mL em cada) e deixados 15 minutos no gelo. Os tubos criogênicos foram deixados *overnight* a -80ºC ou no freezer -70ºC e então congelados em nitrogênio.

3.2.3.2.4 Contagem das células para ensaios

As células foram tripsinizadas e o *pellet* ressuspendido com meio de cultivo. Após homogeneização, a câmara de *Newbauer* foi preenchida e foi feita a contagem de células, com o objetivo de estimar a quantidade de suspensão celular apropriada para ser distribuída em cada frasco de cultura.

3.2.3.3 Procedimento de ensaio

O teste do cometa foi realizado para os corantes originais e seus produtos de degradação. Os mesmos foram avaliados nas concentrações citadas, seguindo o protocolo estabelecido por Tice et al., (2000) com modificações.

2,0 x 10^5 células HepG2 foram colocadas em cada poço da placa para cultura 24 poços TPP® e incubadas 24 horas a 37°C e 5% CO_2. Em seguida as células

foram tratadas com as soluções teste por 4 horas. PBS foi utilizado como controle negativo e benzo(a)pireno 12,5 µg/mL como controle positivo.

Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas (0,1%, 4 min), suspensas e homogeneizadas em 1 mL de meio de cultura MEM . Então foram centrifugadas por 5 minutos a 212 g. O sobrenadante foi descartado e a suspensão de células colocada em contato com agarose de baixo ponto de fusão (10 µL da suspensão para 100 µL de agarose).

Na sequência, esta suspensão foi transferida para lâminas recobertas com agarose de alto ponto de fusão. As lâminas foram recobertas por lamínulas e colocadas na geladeira por 10 minutos. Então, as lamínulas foram removidas e as lâminas colocadas na solução de lise por 24 horas.

Após esse tempo, as lâminas foram colocadas na solução de eletroforese por 20 minutos e daí realizou-se a eletroforese (300mA, 25V, 20 minutos).

Em seguida, as lâminas foram colocadas na solução de neutralização por 20 minutos e em etanol absoluto por 5 minutos.

Após a secagem, as mesmas foram coradas com brometo de etídio (10 µg/mL) e examinadas em microscópio de fluorescência. O comprimento da cauda de migração do DNA foi medido em 50 células por lâmina. Sendo que para cada tratamento foram contadas 2 lâminas (100 células). Os ensaios foram repetidos 3 vezes para maior confiabilidade dos dados gerados.

A análise dos resultados foi feita utilizando visual *score*. Para isso, as células foram classificadas de acordo com o dano genético em grau 0, 1, 2, 3 e 4, conforme a Figura 10 (TICE et al., 2000). Além disso, foi determinado o índice de dano (ID) de acordo com Collins, Ai-Guo e Duthie (1995).

$ID = n1 + 2n2 + 3n3 + 4n4$,

Onde n1 representa o número de células com número 1 de dano; n2 o número de células com número 2 de dano; n3 o número de células com número 3 de dano e n4 o número de células com número 4 de dano.

A Figura 10 mostra núcleos de células HepG2 com diferentes níveis de dano no DNA. Quanto maior a porcentagem de DNA na cauda, maior o dano genético (TICE et al, 2000).

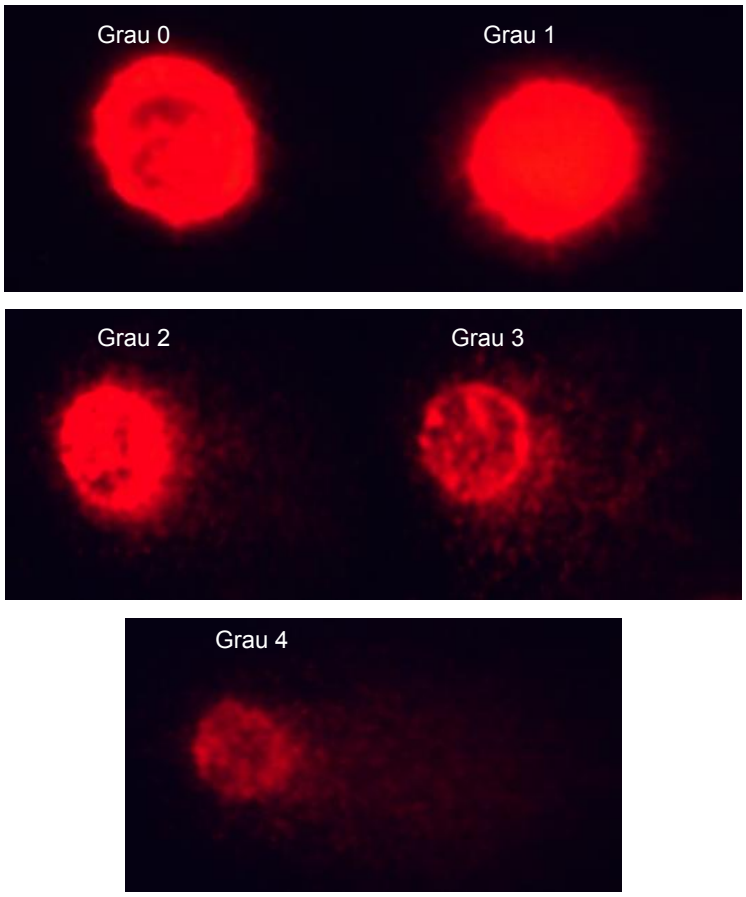


FIGURA 10. Fotomicroscopia de fluorescência tirada desse trabalho mostrando as células HepG2 com diferentes graus de danos no DNA: grau 0, grau 1, grau 2 grau 3 e grau 4 (aumento: 40x, coloração: brometo de etídio).

Uma vez que danos no DNA estão associados com morte celular, paralelamente ao ensaio do cometa foram feitos ensaios de citotoxicidade usando o método de exclusão por *Trypan blue* a fim de assegurar a viabilidade das células (TICE et al., 2000). Este é o método mais comum para avaliar a viabilidade das células e se baseia no fato de que as células mortas, devido ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática, permitem a entrada do *Trypan* se corando de azul e as viáveis permanecem sem coloração (TENNANT, 1964).

Foram utilizadas para os testes células que apresentavam pelo menos 80% de viabilidade.

3.2.3.3.1 Método de exclusão por Trypan Blue

Foi feita uma diluição 1:1 da suspensão de células tratadas e uma solução de *Trypan Blue* a 0,25% em PBS. Tal solução foi homogeneizada e foi retirada uma alíquota para preencher a câmara de *Newbauer* a fim de se fazer a contagem das

células viáveis e não viáveis. Foram avaliadas 100 células de cada concentração em microscópico óptico e a porcentagem de células viáveis foi determinada.

3.2.4 Ensaio de mutagenicidade com Salmonella

Para o ensaio de mutagenicidade com *Samonella*, as concentrações dos corantes tratados foram escolhidas baseando-se nos experimentos realizados com os corantes originais. Os corantes tratados foram avaliados pelas linhagens TA98 e YG1041, visto que estas foram as linhagens que apresentaram resposta positiva para os três corantes originais. Além disso, para efeito de comparação foram testadas as mesmas concentrações utilizadas para os corantes originais, variando entre 0,05 µg/placa a 1000 µg/placa para o corante Disperse Orange 1, 0,01 µg/placa a 100 µg/placa para o corante Disperse Red 1 e 0,1 µg/placa a 400 µg/placa para o corante Disperse Red 13. Os testes foram feitos em triplicata, usando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente.

3.2.4.1 Meios de cultura e soluções

- Meio de Vogel Bonner (50 x):

  Composto por 10 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$), 91,43 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), 500 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 175 g de fosfato de sódio e amônio ($NaNH_4HPO_4.4H_2O$) e 1L de água destilada morna. Após esterilização em autoclave o meio foi estabilizado a 55°C em banho-maria e estocado em refrigerador.
- Solução de glicose 10%:

  20 g de glicose foram dissolvidos em 200 mL de água destilada. Após esterilização o meio foi estabilizado a 55°C em banho-maria.
- Solução de Agar:

  15 g de agar foram dissolvidos em 780 mL de água destilada. Após esterilização o meio foi estabilizado a 55°C em banho-maria.
- Solução de biotina e histidina 0,5 mM:

  0,012 g de D-biotina (MM = 244,3 mol/L) e 0,0078 g de L-histidina (MM = 155 mol/L) foram dissolvidos a quente em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estocada em refrigerador.

- Agar mínimo:

  Este meio de cultura é composto por 200 mL de solução de glicose 10%, 780 mL de solução de agar, 20 mL de meio Vogel Bonner (50x) e 12 mL de solução de biotina e histidina 0,5 mM. Volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas.

- Agar mínimo enriquecido

  As provas genéticas foram realizadas a fim de confirmar as características genéticas das linhagens. Para tanto, foram usados o agar mínimo suplementado com biotina e o agar mínimo suplementado com biotina e excesso de histidina, preparados como se segue:

  Agar mínimo + biotina:

  6 mL da solução de biotina 0,5 mM foram acrescentados em 1L de agar mínimo em substituição à solução de biotina e histidina 0,5 mM.

  Agar mínimo + biotina + excesso de histidina:

  6 mL da solução de biotina 0,5 mM e 10 mL de solução de histidina 26 mM foram acrescentados em 1L de agar mínimo em substituição à solução de biotina e histidina 0,5 mM.

- Solução de biotina 0,5 mM:

  0,012 g de D-biotina (MM = 244,3 mol/L) foram dissolvidos a quente em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estocada em refrigerador.

- Solução de histidina 26 mM:

  0,403 g de L-histidina (MM = 155 mol/L) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Em seguida esta solução foi autoclavada e estocada em refrigerador.

- Caldo nutriente:

  25 g do caldo nutriente foram dissolvidos a frio em 1L de água destilada. Volumes de 20 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave.

- Agar de superfície:

  6 g de Bacto Agar e 5 g de cloreto de sódio (NaCl) foram dissolvidos em 1L de água destilada. Volumes de 250 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave.

- Agar nutriente:

  25 g de caldo nutriente e 15 g de agar foram dissolvidos em 1L de água destilada. Este meio foi autoclavado, estabilizado em banho maria a 55°C e em seguida volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas.
- Solução de ampicilina 8 mg/mL:

  0,08 g de ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água morna. A esterilização desta solução foi feita por membrana filtrante de 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida a mesma foi armazenada em refrigerador em frasco escuro.
- Solução de cristal violeta 0,1%:

  0,1 g de cristal violeta foi dissolvido em 100 mL de água destilada previamente esterilizada. Esta solução foi armazenada à temperatura ambiente.
- Mistura S9 – 4% v/v:

  Cada 100 mL de mistura S9 é composto por 39,5 mL de água destilada estéril, 50 mL de tampão fosfato 0,2 M, 4 mL de NADP, 0,5 mL de glicose-6-fosfato 1,0 M, 2 mL da solução de sais (KCl 1,65 M e $MgCl_2$ 0,4 M) e 4 mL de fração S9, preparadas conforme descrito abaixo. Essa solução sempre foi preparada assepticamente, em banho de gelo, seguindo a ordem dada na adição dos reagentes. Após 3 horas a solução excedente foi descartada.

  Tampão fosfato 0,2 M pH=7,4:

  <u>Solução A</u>

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

  <u>Solução B</u>

  2,76 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4.H_2O$) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

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

Solução de NADP 0,1 M:

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

Solução de glicose-6-fosfato 1 M:

2,821 g de glicose-6-fosfato foram dissolvidos em 10 mL de água destilada estéril. Esta solução foi esterilizada por membrana filtrante de 0,22 µm (MILLIPORE) e armazenada a -20°C.

Solução de sais (cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 0,4 M; cloreto de potássio (KCl) 1,65 M):

8,13 g de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e 12,3 g de cloreto de potássio (KCl) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave esta solução foi mantida em refrigerador.

Fração S9:

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

- Água de diluição

  Solução A (g/L):

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

  Solução B (g/L):

  81,1 g de cloreto de magnésio ($MgCl_2.6H_2O$) foram dissolvidos em 1L de água destilada.

  Solução Final (v/v):

  1,25 mL da solução A foram acrescentados a 5,0 mL da solução B e o volume completado para 1L com água destilada. 90 mL desta solução foram distribuídos em frascos de vidro com tampa de rosca e esterilizados em autoclave.

- Para os controles positivos usados no teste (4-nitroquinolina-1-óxido, 4-nitro-o-fenilene-diamina, 2-nitrofluoreno, 2-aminoantraceno) foram preparadas soluções-mãe de 1 mg/mL em DMSO e as mesmas foram diluídas para as concentrações adequadas.

3.2.4.2 Preparo das culturas de uso rotineiro

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

As culturas de uso rotineiro foram preparadas a cada 6 meses e as características genéticas das linhagens foram previamente avaliadas como descrito: 100 µL de cultura permanente foram inoculados em 20 mL de caldo nutriente com 25 µg/mL de antibiótico (ampicilina para a linhagem TA98 e ampicilina e canamicina para a YG1041) e, após 16 horas de incubação a 37°C e sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi estriada em placas de agar nutriente para isolamento das colônias. Após incubação por 24 horas a 37°C, foram escolhidas ao acaso 5 colônias isoladas de cada linhagem, e estas, inoculadas em 5 mL de caldo nutriente, uma a uma. Após incubação por 16 horas a 37°C e agitação de 150 a 170 rpm, foram aliquotados 180 µL da cultura e 20 µL de DMSO em ampolas para o uso rotineiro e 0,9 mL da cultura e 0,1 mL de DMSO para cultura permanente. As mesmas foram estocadas em freezer a -70°C. Cada cultura crescida nos 5 mL de caldo nutriente foi também inoculada, utilizando zaragatoas esterilizados, em placas de agar mínimo com biotina, agar mínimo com biotina e histidina, e agar nutriente para avaliação das características genéticas. As características genéticas avaliadas estão descritas a seguir.

3.2.4.3 Avaliação das características genéticas das linhagens

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

1) Dependência de histidina

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

de agar mínimo com biotina e excesso de histidina e ausência de crescimento na placa com agar mínimo com biotina.

2) Mutação rfa

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

3) Plasmídeo pKM101

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

4) Plasmídeo pYG233

O procedimento é o mesmo descrito para o plasmídeo pKM101, porém com utilização de 8 mg/mL de sulfato de canamicina como antibiótico.

5) Deleção uvrB

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

- Taxa de reversão espontânea

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

A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 66 horas de incubação a 37°C e deveria estar dentro da faixa esperada para cada linhagem (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de reversão espontânea em revertentes por placa esperada para as linhagens de *Salmonella typhimurium* usadas neste trabalho.

Linhagens	Taxa de reversão esperada	Referências
TA98	25 -75	(Umbuzeiro, Vargas, 2003)
YG1041	60 – 120	RECH (2007)[1]

Importante salientar que a taxa de reversão espontânea pode variar de laboratório para laboratório (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

Das 5 colônias analisadas de cada linhagem foram escolhidas 2 com características genéticas adequadas, e delas, foram preparadas culturas permanentes. As culturas de uso rotineiro correspondentes foram usadas como inócuo durante os ensaios pelo período de 6 meses.

3.2.4.4 Procedimento de ensaio

Para o teste de mutagenicidade com *Salmonella* foram utilizadas as linhagens TA98 e YG1041 cedidas pela Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro. Foi utilizado o protocolo da pré-incubação desenvolvido por Maron e Ames (1983).

3.2.4.4.1 Protocolo de pré-incubação

100 µL das culturas provenientes de ampolas de uso rotineiro foram inoculadas em 20 mL de caldo nutriente e crescidas por 16 horas a 37°C sob agitação de 150 a 170 rpm. Após crescimento as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

Em tubos previamente esterilizados foram colocados 100 µL de cultura da linhagem (10^9 células/mL), 100 µL da solução dos corantes em diferentes concentrações e 500 µL de tampão fosfato 0,2 M para o ensaio na ausência de ativação metabólica ou o mesmo volume da mistura S9 para o ensaio na presença de ativação metabólica.

Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo foram adicionados 2,0 mL de agar de superfície, a mistura foi então homogeneizada e vertida em placa de Petri com 20 mL de agar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37°C (±0,5). O teste foi feito em triplicata.

1 Informação fornecida por Rech (2007)

DMSO foi empregado como controle negativo e o controle positivo no teste sem S9 foi 4-nitroquinolina-1-óxido (0,5 µg/placa para TA98), 4-nitro-o-fenileno-diamina (10,0 µg/placa para a linhagem YG1041). Já para o teste na presença de S9 o controle positivo foi 2-aminoantraceno (2,5 µg/placa para TA98 e 0625 µg/placa para a linhagem YG1041).

O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador de colônias Phoenix CP600 Plus. Os testes foram feitos acompanhados da avaliação da viabilidade e da taxa de reversão espontânea das linhagens.

3.2.4.4.1.1 Avaliação da viabilidade

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

3.2.4.5 Esterilização

Todos os meios de cultura, soluções, vidrarias e placas de Petri utilizados neste trabalho foram esterilizados em autoclave a 121°C (1 atm) por 20 minutos a não ser quando especificado. As pipetas utilizadas neste trabalho eram descartáveis e esterilizadas por radiação *γ*-cobalto.

3.2.4.6 Lavagem de vidraria

Todos os materiais utilizados foram descontaminados em autoclave a 121°C por 40 minutos e mantidos em solução de Extran neutro 5% por 8 horas. Após esse período o material foi enxaguado de 8 a 10 vezes com água corrente e posteriormente lavado uma vez com água destilada.

3.2.5 Ensaio de citotoxicidade com anexina V

O ensaio com anexina V se baseia no fato de que, nos estágios iniciais da apoptose a fosfatidilserina, um fosfolipídeo carregado negativamente, é translocada da parte interna da membrana plasmática para a superfície externa da célula. Anexina V, uma proteína Ca^{2+} dependente, tem alta afinidade por este fosfolipídio, o que a torna um marcador sensível de morte celular por apoptose. Entretanto, essa exposição da fosfatidilserina também ocorre na necrose, o que diferencia as duas vias de morte é que na apoptose a célula permanece com a membrana intacta. Sendo assim, é necessário executar o ensaio em conjunto com um teste de exclusão de corante (como ensaio de exclusão do *Trypan blue*) a fim de determinar a integridade da membrana. As células apoptóticas excluem todos os corantes que estão em uso nos ensaios de viabilidade, como o iodeto de propídeo (PI), o que não ocorre com as células necróticas, nas quais esse corante se liga às bases nitrogenadas do DNA (VERMES et al., 1995).

Para o ensaio de citotoxicidade com anexina V as concentrações foram escolhidas baseando no ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* para os corantes originais com a linhagem YG1041 na ausência de S9, condição em que se observou a maior resposta mutagênica. Assim, foram testadas as concentrações: 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, e 10,0 µg/mL para os corantes originais e tratados dissolvidos em PBS. Esta parte do trabalho foi desenvolvida em parceria com o professor Dr. Carlos Curti, do laboratório de Bioquímica da FCFRP/USP.

Para essa metodologia foram utilizados kits da BD Pharmingen™, San Diego, compostos por um tampão, preparado a 10% e soluções concentradas de anexina e iodeto de propídeo. A anexina utilizada nos ensaios foi preparada a 1% e o iodeto de propídeo a 10%, ambos diluídos no tampão do kit.

Em cada poço da placa foram colocadas 1×10^5 células HepG2 e meio MEM completo resultando num volume final de 3 mL. As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas.

Após a incubação, o meio completo dos poços foi retirado e foram colocados 3 mL das amostras dos corantes nas concentrações citadas em duplicata. Incubou-se novamente a 37°C e 5% CO_2 por 4, 24, 48 e 72 horas. O meio DMEN completo foi utilizado como controle negativo e tertbutil hidroperóxido (tBOOH) 100 µM como controle positivo.

O meio dos poços de cada duplicata foi transferido para tubos cônicos marcados. 1 mL de PBS foi adicionado em cada poço, homogeneizado e transferido para os respectivos tubos. 1 mL de tripsina 0,1% foi adicionado em cada poço e então as placas foram incubadas por 3 minutos a 37°C. A tripsina foi homogeneizada nos poços utilizando pipeta Pasteur e em seguida transferida para seu respectivo tubo. Essa solução de tripsina continha as células que se soltaram dos poços. Por último os poços foram lavados com meio completo e este transferido para os respectivos tubos.

Os tubos cônicos foram centrifugados a 1000gs e 10°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos colocados em banho de gelo. 1 mL de PBS gelado foi adicionado em cada tubo, homogeneizado e centrifugado novamente a 1000gs e 10°C por 10 minutos. O PSB de cada tubo foi descartado e os tubos foram mantidos em banho de gelo. O conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos próprios para análise em citômetro de fluxo e então foram adicionados 100 µL de uma solução tampão contendo anexina V em cada tubo. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos. A anexina V foi utilizada para detectar a externalização da fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática durante o processo de apoptose.

Por último foram adicionados 100 µL de uma solução tampão contendo iodeto de propídeo (PI) em cada tubo e estes foram colocados no citômetro de fluxo para análise. O iodeto de propídeo, em princípio, não penetra a membrana citoplasmática de uma célula viva, o que reflete a integridade da membrana. Entretanto, uma vez que a célula entrou em processo de necrose, este fluorocromo se liga a bases nitrogenadas do DNA, corando intensamente o núcleo da célula. Assim, a anexina foi usada para detectar morte celular por apoptose e o PI para detectar morte por necrose.

3.2.6 Ensaio de ecotoxicidade utilizando Daphnia similis

Esses experimentos foram realizados na CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) em Ribeirão Preto com a colaboração do senhor Eduardo Angelino Savazzi e Maristela Rodini Luiz Ferraz.

3.2.6.1 Soluções

- Água de cultivo e de diluição

Solução A (g/L):

1,5 g de sulfato de cálcio ($CaSO_4.2H_2O$) foram dissolvidos em 1L de água processada (água com condutividade menor que 10 µS/cm, após tratamento por destilação, desionização ou ultrapurificação).

Solução B (g/L):

0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 4,8 g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e 6,1 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) foram dissolvidos em 1L de água processada.

Para o preparo da água de cultivo e diluição foram adicionados 20 mL da solução A e 10 mL da solução B em 970 mL de água processada. Essa solução deveria apresentar pH entre 7,0 e 7,6 e dureza total entre 40 mg de $CaCO_3$/L e 48 mg $CaCO_3$/L. Caso a dureza fosse inferior a 40 mg de $CaCO_3$/L, adicionava-se 0,5 mL da solução A e 0,25 mL da solução B para cada miligrama de dureza a ser aumentado. Se a dureza fosse superior a 48 mg de $CaCO_3$/L , adicionava-se água processada. O ajuste de pH foi feito com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH). Além disso, a concentração de oxigênio deveria estar acima de 80% de saturação.

3.2.6.2 Culturas das Daphnias

Daphnia similis foram obtidas do Laboratório de Ecotoxicologia da CETESB em Ribeirão Preto. Esses organismos (20 organismos/L) foram mantidos a 20 ± 2ºC, com intensidade de luz de 1.000 lux, sob 16:08 h (luz / escuro) e alimentados diariamente com algas 3,2 x 10^6 células de *Selenastrum capricornutum* por *Daphnia similis* por dia e 0,02 mL de solução de ração (Tetramin) por *Daphnia similis*/dia (BURATINI, BERTOLETTI, ZAGATTO, 2004). Duas vezes por semana, antes do fornecimento de água às culturas, os organismos foram transferidos para um recipiente limpo contendo água de manutenção nova (a diferença entre a temperatura da água das culturas e da água de manutenção não poderia ser superior a 2 ºC). A cada troca de água foi anotado o número de adultas vivas e se a sobrevivência das mesmas fosse inferior a 80% no intervalo de uma semana precedente ao teste de toxicidade, os jovens provenientes desta cultura não eram

utilizados nos ensaios. Na segunda renovação semanal, a cultura mais antiga, com idade entre 26 e 30 dias foi descartada, iniciando-se uma nova com 20 organismos jovens. Para iniciar a cultura foram utilizados organismos jovens entre 6 e 24 horas de idade, obtidos a partir de fêmea com idade entre 7 e 28 dias.

3.2.6.3 Carta-controle de sensibilidade

Mensalmente a sensibilidade do organismo-teste foi avaliada por meio de um ensaio utilizando cloreto de potássio (KCl) nas concentrações de 250 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L e 2000 mg/L como composto de referência. Se o valor de EC50 obtido no ensaio não estivesse compreendido num intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos, os organismos eram descartados.

3.2.6.4 Procedimento de ensaio

Para os ensaios de ecotoxicidade, *Daphnia similis* e Microtox®, as concentrações foram escolhidas baseando em ensaios preliminares (dados não mostrados). Sendo assim, foram testadas as concentrações: 0,001 mg/L, 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, usando água destilada como solvente.

Para cada concentração foram realizadas 4 repetições e, em cada uma foram utilizados cinco organismos jovens (6-24 h de idade) expostos ao corante por 48 h em um tubo de vidro de 10 mL. Após o período de exposição de 48 h, as Daphnias imobilizadas foram contadas. O teste era considerado válido se a taxa de imobilização fosse inferior a 10% no grupo controle negativo (OECD, 2004).

3.2.7 Ensaio de ecotoxicidade Microtox®

3.2.7.1 Soluções

- Solução de sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$)

  0,01 g de sulfato de zinco foram dissolvidos em 100 mL de cloreto de sódio (NaCl) a 2%. Essa solução foi mantida em refrigerador (2 a 8 °C) por até 4 meses.
- Diluente Microtox

  20 g de cloreto de sódio foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada. Essa solução foi mantida em refrigerador (2 a 8 °C) por até 1 ano.

- Solução de ajuste osmótico (SAO)

  22 g de cloreto de sódio foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Essa solução foi mantida em refrigerador (2 a 8 °C) por até 1 ano.
- Reagente Microtox

  Cultura liofilizada de *Vibrio fischeri*, contendo 108 células por ampola, mantido estocado entre -20°C e -25°C.
- Solução de reconstituição

  Solução utilizada para reconstituição do reagente Microtox, fornecida pela Azur Environmental com o certificado de qualidade.
- Reconstituição do reagente Microtox

  A ampola contendo a bactéria luminescente foi retirada do freezer e então foi adicionado 1 mL da solução de reconstituição contida na cubeta do poço de pré-resfriamento. A solução foi homogeneizada utilizando um micropipetador e vertida na cubeta do poço de pré-resfriamento, ficando viável para uso até 3 horas.

3.2.7.2 Procedimento de ensaio

Os testes de toxicidade aguda foram realizados utilizando o procedimento Microtox com o analisador Microbics modelo 500 (AZUR Ambiental, Carlsbab, CA) e os procedimentos descritos no manual de usuário Microtox usando o protocolo "81,9% de Teste Básico", recomendado para amostras com baixa toxicidade (Azur Environmental, 1998).

Uma série de nove soluções diluídas dos corantes, osmoticamente ajustadas com cloreto de sódio (NaCl) a 22% foram adicionadas a suspensões bacterianas de *Vibrio fischeri* (10^6 células) e a emissão de luz foi medida antes da adição da amostra e após 5 e 15 minutos de contato a uma temperatura constante de 15°C. Os dados apresentados neste trabalho foram obtidos após quinze minutos de reação. Uma solução de NaCl 2% foi utilizada como controle negativo e sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$) 100 mg/L, como controle positivo. Visto que a cor e o pH são interferentes do ensaio, antes da realização do mesmo, foram medidos os valores de absorbância e pH das amostras (dados não mostrados) e nenhum desses parâmetros interferiram nos resultados .

3.2.8 Ensaios de citotoxicidade utilizando condrócitos da articulação bovina cultivados em monocamadas e em 3D

Os ensaios para a avaliação da citotoxicidade dos azo corantes originais Disperse Orange, 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 em células HepG2 e condrócitos da articulação bovina em monocamadas e 3D foram realizados na Universidade de Oxford e na empresa Zyoxel LTDA em Oxford, Inglaterra, durante a realização do meu doutorado sanduíche. Para estes experimentos, as concentrações dos corantes originais foram escolhidas de acordo com a solubilidade dos mesmos, variando de 0,3 µg/mL a 20 µg/mL para o corante Disperse Orange 1, 0,5 µg/mL a 30 µg/mL para o corante Disperse Red 1 e 0,4 µg/mL a 40 µg/mL para o corante Disperse Red 13 dissolvidos em PBS.

3.2.8.1 Soluções

- Meio de cultura incompleto

  Para uma garrafa de 500 mL de meio incompleto fornecido pela ATCC®, foram adicionados 5 mL de uma solução de antibiótico/antimicótico 100x e 5 mL de uma solução 0,5 M NaCl + 0,2 M KCl.
- Meio de cultura completo

  Composto pelo meio incompleto e 10% de soro bovino fetal.
- Solução 5 M NaCl + 0,2 M KCl

  Em 250 mL de água destilada foram adicionados 73,05 g de NaCl e 3,73 g de KCl. A solução foi esterilizada em autoclave (121°C por 20 minutos) e estocada à temperatura ambiente.
- Colagenase 0,55 mg/mL

  25 mg de colagenase foram dissolvidos em 45 mL de meio incompleto. Solução preparada no momento do uso.
- Solução de alginato 1,2%

  1,6 g de alginato foram vagarosamente adicionados a 100 mL de NaCl 0,9% sob agitação (2 a 5 minutos). Após esse período a solução foi vedada com parafilme e colocada sob agitação por 1 – 2 horas à temperatura de 30°C. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo utilizando uma membrana 0,22 µm e estocada à temperatura ambiente.

- NaCl 0,9% (154 mM)

  4,5 g de NaCl foram dissolvidos em 500 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave (121°C por 20 minutos) e estocada à temperatura ambiente.
- $CaCl_2$ 102 mM

  25,5 mL de uma solução estoque 1M de $CaCl_2$ foram adicionados a 224,5 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave (121°C por 20 minutos) e estocada à temperatura ambiente.
- Tampão citrato 55 mM pH 7,4

  Em 400 mL de água destilada foram adicionados 8,08 g de citrato de sódio (55 mM), 9,3 g de EDTA (50 mM) e 4,4 g de NaCl (0,15 M). O volume foi completado com água destilada para 500 mL, a solução foi esterilizada por filtração a vácuo utilizando uma membrana 0,22 µm e estocada à temperatura ambiente.
- Solução MTT (5 mg/mL)

  50 mg do sal MTT foram dissolvidos em 10 mL de PBS. A solução foi filtrada e estocada no freezer.

3.2.8.2 Isolamento dos condrócitos – procedimento de ensaio

Patas de boi vindas de um abatedouro foram dissecadas e a cartilagem do joelho exposta. Com um bisturi a cartilagem do joelho de cada pata foi coletada, colocada em um tubo cônico com 45 mL de meio incompleto e 25 mg de colagenase e incubada por 20 horas a 37°C sob agitação. Após esse período, a solução foi filtrada utilizando filtros de alumínio estéreis, o volume filtrado foi completado para 50 mL com meio incompleto e então a solução foi centrifugada duas vezes a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com meio completo para 20 mL.

A contagem das células foi feita utilizando uma câmara de *Newbauer* e coloração por *Trypan Blue* a fim de avaliar a viabilidade das mesmas. O volume de suspensão foi dividido para cultivo em monocamadas e cultivo em 3D. Para o primeiro, foram colocadas 0,25 x 10^6 células em frascos de cultura de 25 cm^2 e 5 mL de meio completo.

O volume de suspensão celular restante foi usado para o cultivo em 3D em esferas de alginato. Para cada mL de alginato foram usados 4 x 10^6 células. Assim,

foram feitos os cálculos e então a suspensão celular foi centrifugada (2000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante descartado e o volume adequado da solução de alginato 1,2% foi adicionado à suspensão celular. A solução células + alginato foi homogeneizada com uma pipeta e colocada em uma seringa com uma agulha de 21G. Esta solução foi gotejada para dentro de um béquer contendo 25 mL de $CaCl_2$ 102 mM, formando assim as esferas de alginato. É importante ressaltar que a solução deve ser gotejada vagarosamente (aproximadamente 1 gota por segundo). Estas foram retiradas da solução usando uma pipeta Pasteur plástica e lavadas 3 vezes com PBS e 2 vezes com meio completo. Em uma placa de 6 poços foram colocadas 25 esferas/poço e 2,5 mL de meio completo.

As placas contendo as esferas de alginato e os frascos de cultura em monocamadas foram incubados a 37°C e 5% de CO_2 por 7 dias, período no qual os condrócitos atingem 80% de confluência e estão prontos para a execução de ensaios. O meio foi trocado uma vez a cada 3 dias.

3.2.8.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT em condrócitos em monocamadas e em 3D

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico baseado na capacidade de enzimas mitocondriais de células vivas converterem o (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) (MTT) em um cristal insolúvel. O nível de viabilidade detectada é um indicador da atividade mitocondrial e, portanto, do estado fisiológico das células. A quantidade de cristal formada pode ser quantificada em um espectrofotômetro e usada como uma medida do número celular e/ou nível de ativação (ORIVE et al., 2003).

Para os ensaios em monocamadas, os condrócitos foram plaqueados na densidade de 1×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas. Após esse período diferentes concentrações dos corantes e um controle negativo (somente meio) foram colocados em contato com as células por 24, 48 e 72 horas. Então, o meio foi substituído pelo meio incompleto e as células foram incubadas com MTT (concentração final de 0,5 mg/mL) a 37°C e 5% CO_2 por 3 horas. O meio foi então descartado e foram adicionados 100 µL de DMSO para dissolver os cristais. A absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de placas de ELISA (*microenzyme-linked immunosorbent assay*). A viabilidade celular

foi expressa como porcentagem das células não tratadas, as quais serviram como controle negativo e designadas como 100% de atividade mitocondrial. Os valores do branco, correspondentes à absorbância da solução de MTT foram subtraídos de todas as amostras.

Para o ensaio em 3D o mesmo procedimento foi realizado, entretanto foram adicionadas 3 esferas de alginato por poço (aproximadamente 1,2 x 10^5 células).

3.2.8.4 Ensaio do lactato em condrócitos em monocamadas e em 3D

O ensaio foi executado de acordo recomendações do kit Trinity biotech procedure nº 735.

Ácido lático é um produto de metabolização de carboidratos e é convertido a piruvato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima lactato oxidase. Durante o ensaio é utilizado um precursor cromógeno que, na presença do H_2O_2 formado, é catalisado por uma peroxidase e produz um corante com um máximo de absorção a 540 nm. Assim, a intensidade da coloração é proporcional à quantidade de lactato produzido pelas células.

O ensaio foi executado com o meio contendo diferentes concentrações dos corantes utilizados pelas células durante o ensaio do MTT em períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação. Sendo assim, as células foram utilizadas para o ensaio do MTT e o meio para o ensaio do lactato. É importante ressaltar que a interferência da coloração dos corantes foi retirada diminuindo o valor da absorbância obtida no ensaio pelo valor da absorbância do meio com cada concentração dos corantes.

Os valores de lactato produzido pelos condrócitos foram obtidos por uma curva de calibração utilizando o padrão lactato nas concentrações: 0 mM, 1 mM, 2 mM, e 3 mM.

3.2.9 Caracterização das células HepG2 em monocamadas e em 3D

3.2.9.1 Soluções

- Meio de cultura incompleto
- Para uma garrafa de 500 mL de meio incompleto fornecido pela ATCC®, foram adicionados 5 mL de uma solução de antibiótico/antimicótico 100x, 5 mL de glutamina, 12,5 mL de HEPES 25 mM e 2,5 ml de $CaCl_2$.
- Meio de cultura completo

Composto pelo meio incompleto e 10% de soro bovino fetal.

E as seguintes soluções citadas previamente:

- Solução de alginato, porém na concentração final de 1,8%
- NaCl 0,9% (154 mM)
- $CaCl_2$ 102 mM
- Tampão citrato 55 mM pH 7,4
- Biorreatores Tissueflex®

3.2.9.2 Formação das esferas de alginato contendo células HepG2

Após atingir 80% de confluência, as células HepG2 foram tripsinizadas e a suspensão celular foi misturada com a solução de alginato na densidade de 2 x 10^6 células/mL. Após homogeneização, a solução células + alginato foi colocada em uma seringa, acoplada a uma bomba e adicionada à solução de $CaCl_2$ 102mM num fluxo de 10000 µL/hora (Figura 11), formando assim as esferas de alginato com tamanho aproximado de 400 µm, as quais foram lavadas duas vezes com NaCl 0,9% e uma vez com meio completo. Após esse procedimento, as esferas foram colocadas em placas de 6 poços e em bioreatores de 10 poços para realização dos ensaios. É importante ressaltar que a viabilidade das células foi avaliada antes de misturá-las com o alginato, na suspensão de alginato e dentro das esferas.

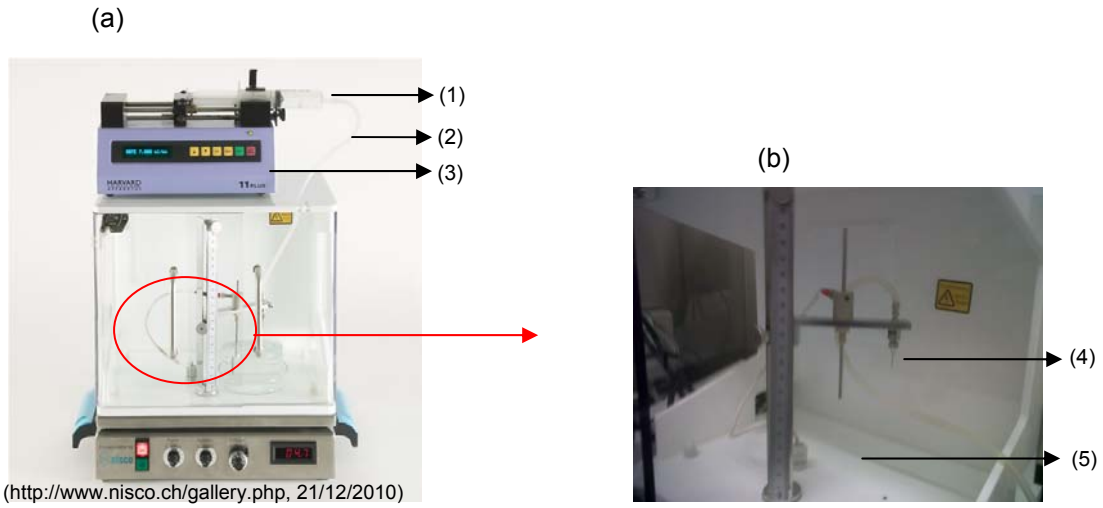


FIGURA 11. (a) Gerador de esferas de alginato utilizado nos ensaios. (b) Enfoque na parte do equipamento por onde saem as gotas da solução alginato + células. (1) seringa onde é colocada a solução de alginato + células, (2) mangueira que conduz a solução até a agulha, (3) bomba responsável pelo fluxo de 10000 µL/hora (4) agulha na qual são formadas as esferas, (5) local onde é colocado o frasco com a solução de $CaCl_2$ 102 mM.

3.2.9.3 Ensaios realizados para caracterização das células HepG2

Para caracterização das células HepG2 em monocamadas foram plaqueadas 1 x 10^5 células/poço em placas de 24 poços. Para os ensaios em 3D a mesma quantidade de células (cerca de 60 mg/poço de esferas de alginato) foram plaqueadas em placas de 24 poços (cultura estática) e em biorreatores Tissueflex® (cultura em perfusão). Após 1, 4, 7, 11 e 14 dias em cultura, foram feitos ensaios de viabilidade e morfologia das células cultivadas nas diferentes condições.

3.2.9.3.1 Viabilidade

As esferas de alginato foram dissolvidas em tampão citrato 55 mM e a viabilidade foi feita pelo método de exclusão por *Trypan Blue*.

3.2.9.3.2 Morfologia – filamentos de F-actina

Os filamentos de F-actina foram corados utilizando faloidina Texas Red –X e o núcleo foi corado pelo meio Vectashield com DAPI.

3.2.10 Ensaios de citotoxicidade utilizando HepG2 em monocamadas e em 3D

3.2.10.1 Soluções

Foram utilizadas as mesmas soluções do ensaio de caracterização das células HepG2 (*item 3.2.9*)

3.2.10.2 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT em células HepG2

O mesmo procedimento utilizado em condrócitos foi repetido aqui, entretanto, com uma ressalva: após testar os corantes utilizando o ensaio MTT em condrócitos foi percebido que os mesmos não atravessavam a cápsula de alginato, o que inviabilizou o teste em 3D, visto que os condrócitos não formam esferoides, outra forma de ensaio em 3D no qual as células são cultivadas em cápsulas de alginato, formam esferoides e estes são liberados através da dissolução da cápsula de alginato, conforme explicado na introdução (*item 1.5.1*). Uma vez que as células HepG2 têm a capacidade de formarem esferoides, todos os ensaios de citotoxicidade aqui reportados foram feitos utilizando esferoides de células HepG2 previamente cultivadas em esferas de alginato.

O ensaio MTT foi realizado para testar os azo corantes originais Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 em monocamadas e 3D em cultura estática (esferoides plaqueados) e Disperse Red 13 em monocamadas, 3D em cultura estática e 3D em perfusão em períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação. Para isso, foram plaqueadas 1 x 10^5 células/poço em placas de 24 poços para cultura em monocamadas e a mesma quantidade de células, porém agregadas em esferoides (formados de acordo com o item *3.2.10.2.1)* para os ensaios em 3D.

3.2.10.2.1 Formação dos esferoides

Foram feitas esferas de alginato contendo células HepG2 como citado *no item 3.2.9.2*. Após lavá-las com meio completo, as mesmas foram colocadas em placas de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 5 dias com meio completo, formando esferoides com tamanho de 34,1±7,7 µm. Então as esferas foram colocas em um tubo graduado, misturadas com tampão citrato 55 mM na proporção 1:1 e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 15 minutos. Após completa dissolução das esferas, os esferoides foram liberados.

3.2.10.2.2 Cultura em perfusão

Após plaqueamento dos esferoides em biorreatores, os mesmos foram colocados em uma incubadora a 37°C e ligados a uma bomba com seringas contendo meio completo e o corante Disperse Red 13 em diferentes concentrações como ilustra a Figura 7a. Meio completo foi utilizado como controle negativo e o branco foi feito só com o meio. A perfusão foi realizada num fluxo de 25 µL/hora.

3.2.10.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando CCK-8 em células HepG2

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) é um ensaio colorimétrico que usa o sal tetrazólio altamente solúvel em água WST-8 (*Water soluble Tetrazolium salts*), ([2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio)]), para determinação do número de células viáveis em ensaios de proliferação celular e citotoxicidade. WST-8 é reduzido pelas desidrogenases nas células originando um produto amarelo (formazan) que é solúvel no meio utilizado na cultura celular. A quantidade do produto amarelo gerado pela atividade das desidrogenases é diretamente proporcional ao número de células vivas (DOJINDO, 2010). Resumidamente, após

expor as células aos corantes nos tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas, 10 µL da solução de CCK-8, contendo o WST-8, foram adicionados em cada poço das placas, as quais foram incubadas por 3 horas a 37°C e 5% CO_2. A absorbância foi medida a 450 nm usando um leitor de placas de ELISA.

O controle negativo foi designado como 100% de atividade de desidrogenase, e a viabilidade celular foi expressa como porcentagem das células não tratadas. Os valores do branco, correspondentes à absorbância da solução de CCK-8 foram subtraídos de todas as amostras.

3.2.11 Análise estatística

Para o ensaio do cometa, da anexina V, MTT, lactato e CCK-8 os resultados foram estatisticamente avaliados usando one way ANOVA com o Dunnett's post hoc test. Significância foi encontrada quando $p < 0,05$.

Para o ensaio da caracterização das células HepG2, os dados foram analisados usando one way ANOVA com o Bonferroni's Multiple Comparison Test. Significância foi encontrada quando $p < 0,05$.

Os resultados gerados pelo ensaio Salmonella/microssoma foram expressos através da inclinação da reta no gráfico e usando o software Salanal, um programa estatístico desenvolvido pelo Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, N.C. USA, usando o modelo de Bernstein, o qual utiliza ANOVA e regressão linear (BERNSTEIN et al., 1982, UMBUZEIRO, VARGAS, 2003).

Para o ensaio com *Daphnia similis*, os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o método de Spearman Trimmed (HAMILTON, RUSSO, THURSTON, 1977) e estão expressos como valores de EC50.

Todos os dados gerados no ensaio Microtox® foram analisados por um software on-line, Microtox Omni e uma vez que é um ensaio mais restritivo, os resultados estão expressos como EC20.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da genotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o teste do cometa

Disperse Orange 1

Conforme foi dito na introdução, os resultados gerados no teste do cometa foram expressos como índice de dano (ID) numa relação diretamente proporcional, ou seja, quanto maior o ID mais genotóxico será o composto testado.

O corante Disperse Orange 1 exibiu genotoxicidade nas concentrações testadas tanto na sua forma original quanto clorada, sendo que após a cloração a genotoxicidade persistiu somente nas maiores concentrações e com o ID menor do que na forma original, o que mostra que a cloração diminuiu a potência genotóxica desse corante. Após o tratamento por fotoeletrocatálise esse corante deixou de exibir a genotoxicidade observada, como mostra a Tabela 3.

TABELA 3. Resultados do ensaio do cometa após exposição por 4 horas de células HepG2 ao corante Disperse Orange 1 original, clorado e fotoeletrocatalisado. Resultados expressos como média de três repetições.

Corante	Concentração (µg/mL)	Nº de células com cometas (%)	Distribuição dos cometas					ID (média ± SD)
			0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	
Cont. neg.	0	34,67	65,33	29,00	2,67	1,33	1,67	45,00 ± 12,49
BZO	12,5	83,00	17,00	15,00	19,67	12,33	36,00	253,33 ± 85,45
	0,05	35,00	65,00	29,00	2,33	2,33	1,33	46,00 ± 2,65
Orange 1	0,1	49,67	50,33	35,33	9,33	2,67	2,33	71,33 ± 7,57
original	0,2	75,00	32,67	34,67	16,67	9,33	6,67	119,00 ±12,53**
	0,4	76,00	28,00	36,00	17,67	12,67	5,67	126,67 ± 14,57**
	1,0	71,00	27,67	26,00	16,67	13,00	16,67	136,33 ± 11,50**
	2,0	73,00	25,33	25,67	16,33	15,00	17,67	161,33 ± 17,50**
	4,0	78,00	27,67	28,67	19,00	12,33	12,33	136,00 ± 24,98**
Cont. neg.	0	25,00	75,00	18,33	5,00	0,33	1,33	34,67 ± 6,03
	12,5	78,00	22,00	29,00	10,00	19,33	19,67	185,67 ± 4,62
BZO	0,2	34,67	65,33	30,33	2,33	1,33	0,67	41,67 ± 8,08
Orange 1	0,4	35,00	65,67	28,00	4,33	1,33	0,67	43,33 ± 10,02
clorado	1,0	31,00	65,67	23,00	6,67	2,67	2,00	52,33 ± 13,20
	2,0	42,00	58,00	22,67	12,67	4,67	2,00	70,00 ± 11,53*
	4,0	43,33	56,67	24,00	11,00	5,00	3,33	74,33 ± 17,56**
Cont. neg.	0	31,00	69,00	21,67	5,67	3,00	0,67	44,67 ± 15,18
BZO	12,5	78,00	22,00	29,00	10,00	19,33	19,67	185,67 ± 4,62
Orange 1	0,2	36,00	64,00	24,00	9,67	2,33	0,00	50,33 ± 8,96
fot.	0,4	34,00	65,33	20,00	8,33	4,67	1,67	57,33 ± 5,03
	1,0	33,67	66,33	25,00	4,67	2,00	2,00	48,33 ± 7,37
	2,0	38,00	62,00	24,67	9,00	2,33	2,00	57,67 ± 13,80
	4,0	37,33	62,67	24,67	8,00	2,67	2,00	56,67 ± 18,90

ID: índice de dano; SD: desvio padrão; BZO: benzo[a]pireno
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Disperse Red 1

Este corante, assim como o Disperse Orange 1, apresentou genotoxicidade no seu estado original e clorado. O tratamento por cloração também diminuiu a genotoxicidade apresentada por esse corante na sua forma original, com a genotoxicidade persistindo somente nas maiores concentrações. A fotoeletrocatálise removeu a genotoxicidade apresentada por esse corante antes do tratamento, como mostra a Tabela 4.

TABELA 4. Resultados do ensaio do cometa após exposição por 4 horas de células HepG2 ao corante Disperse Red 1 original, clorado e fotoeletrocatalisado. Resultados expressos como média de três repetições.

Corante	Concentração (µg/mL)	Nº de células com cometas (%)	Distribuição dos cometas					ID (média ± SD)
			0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	
Cont. neg.	0	34,67	65,33	29,00	2,67	1,33	1,67	45,00 ± 12,49
BZO	12,5	83,00	17,00	15,00	19,67	12,33	36,00	253,33 ± 85,45
Red 1	0,05	35,33	64,67	26,33	4,00	3,33	1,67	51,00 ± 4,58
original	0,1	55,67	44,33	40,00	9,67	3,33	2,67	80,00 ± 11,14
	0,2	66,33	33,67	39,33	11,33	9,33	5,67	112,67 ± 12,06**
	0,4	68,00	32,00	42,33	9,00	9,33	7,33	117,67 ± 22,48**
	1,0	64,33	35,67	36,67	9,33	7,33	11,00	121,33 ± 36,12**
	2,0	63,33	36,67	37,33	5,33	12,00	8,67	118,67 ± 9,50**
	4,0	64,67	35,33	45,33	9,67	5,67	4,00	97,67 ± 13,50*
Cont. neg.	0	25,00	75,00	18,33	5,00	0,33	1,33	34,67 ± 6,03
BZO	12,5	78,00	22,00	29,00	10,00	19,33	19,67	185,67 ± 4,62
Red 1	0,2	18,67	81,33	9,33	5,00	3,67	0,67	33,00 ± 8,66
clorado	0,4	23,00	76,67	16,33	2,67	3,00	1,33	36,00 ± 4,58
	1,0	32,00	68,00	21,00	6,67	2,00	2,33	49,67 ± 13,32
	2,0	54,33	45,67	39,33	8.67	3,33	3,00	78,67 ± 16,65**
	4,0	51,00	49,00	36,33	8,67	3,00	3,00	74,67 ± 8,96 **
Cont. neg.	0	31,00	69,00	21,67	5,67	3,00	0,67	44,67 ± 15,18
BZO	12,5	78,00	22,00	29,00	10,00	19,33	19,67	185,67 ± 4,62
Red 1 fot.	0,2	29,33	70,67	19,67	7,00	2,00	0,67	42,33 ± 9,50
	0,4	25,00	75,00	16,67	4,67	1,67	2,00	39,00 ± 10,82
	1,0	32,67	67,33	22,33	5,33	3,33	1,67	49,67 ± 15,82
	2,0	31,67	68,33	18,33	8,33	2,67	2,33	52,33 ± 11,93
	4,0	35,67	64,33	23,67	5,33	4,00	2,67	57,00 ± 17,69

ID: índice de dano; SD: desvio padrão; BZO: benzo[a]pireno
* $p < 0,05$; * * $p < 0,01$

Disperse Red 13

Assim como os dois corantes anteriores, o Disperse Red 13 original e clorado também induziu genotoxicidade nas células HepG2, o que não aconteceu após o seu tratamento por fotoeletrocatálise, como mostra a Tabela 5. Além disso, observa-se que após tratamento por cloração, embora o ID tenha diminuído, o efeito genotóxico permanece em todas as concentrações testadas, o que pode ser atribuído ao átomo de cloro na estrutura química desse corante.

TABELA 5. Resultados do ensaio do cometa após exposição por 4 horas de células HepG2 ao corante Disperse Red 13 original, clorado e fotoeletrocatalisado. Resultados expressos como média de três repetições.

Corante	Concentração (µg/mL)	Nº de células com cometas (%)	Distribuição dos cometas					ID (média ± SD)
			0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	
Cont. neg.	0	25,00	75,00	18,33	5,00	0,33	1,33	34,67 ± 6,03
BZO	12,5	83,00	17,00	15,00	19,67	12,33	36,00	253,33 ± 85,45
Red 13	0,05	36,67	63,33	29,00	4,00	2,00	1,67	49,67 ± 7,09
original	0,1	45,33	54,67	32,67	6,67	3,00	3,00	67,00 ± 10,44
	0,2	61,33	38,67	39,67	12,00	4,00	5,33	97,00 ± 31,95*
	0,4	60,67	39,33	40,00	9,00	7,33	4,33	97,33 ± 25,74**
	1,0	63,00	36,00	39,33	10,67	7,00	7,00	109,67± 36,02**
	2,0	71,67	28,33	33,67	15,00	11,33	11,67	144,33±40,02**
	4,0	70,00	30,00	26,33	20,67	10,67	12,33	149,00±18,33**
Cont. neg.	0	25,00	75,00	18,33	5,00	0,33	1,33	34,67 ± 6,03
BZO	12,5	78,00	22,00	29,00	10,00	19,33	19,67	185,67 ± 4,62
Red 13	0,2	57,67	45,67	44,33	5,33	3,00	1,67	70,67 ± 10,02*
clorado	0,4	51,00	48,33	40,33	5,67	3,33	2,33	71,00 ± 18,68*
	1,0	47,33	52,67	33,67	8,00	3,67	2,00	68,67± 14,74*
	2,0	49,33	50,67	34,67	6,67	4,33	3,67	75,67 ± 8,50**
	4,0	60,67	39,33	44,33	8,33	3,67	4,33	89,33 ± 10,69**
Cont. neg.	0	31,00	69,00	21,67	5,67	3,00	0,67	44,67 ± 15,18
BZO	12,5	78,00	22,00	29,00	10,00	19,33	19,67	185,67 ± 4,62
Red 13 fot.	0,2	32,00	68,00	27,00	3,67	1,00	0,33	38,67 ± 8,50
	0,4	31,00	68,33	23,00	6,00	2,33	0,00	42,00 ± 8,54
	1,0	30,33	69,67	21,00	6,67	2,67	0,00	42,33 ± 8,02
	2,0	35,00	65,00	23,33	9,33	2,33	0,00	49,00 ± 6,08
	4,0	33,33	66,67	19,67	9,67	2,67	1,33	52,33 ± 9,07

ID: índice de dano; SD: desvio padrão; BZO: benzo[a]pireno
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Conforme dito anteriormente, ensaios com *Trypan Blue* foram realizados paralelamente ao ensaio do cometa a fim de analisar a viabilidade celular. Para todos os ensaios a viabilidade estava acima de 90%.

A Figura 12 sumariza as Tabelas 3, 4 e 5, mostrando o efeito dos tratamentos na genotoxicidade apresentada pelos corantes originais. Percebe-se que para os três corantes a cloração diminuiu a genotoxicidade, ao passo que a fotoeletrocatálise removeu-a completamente.

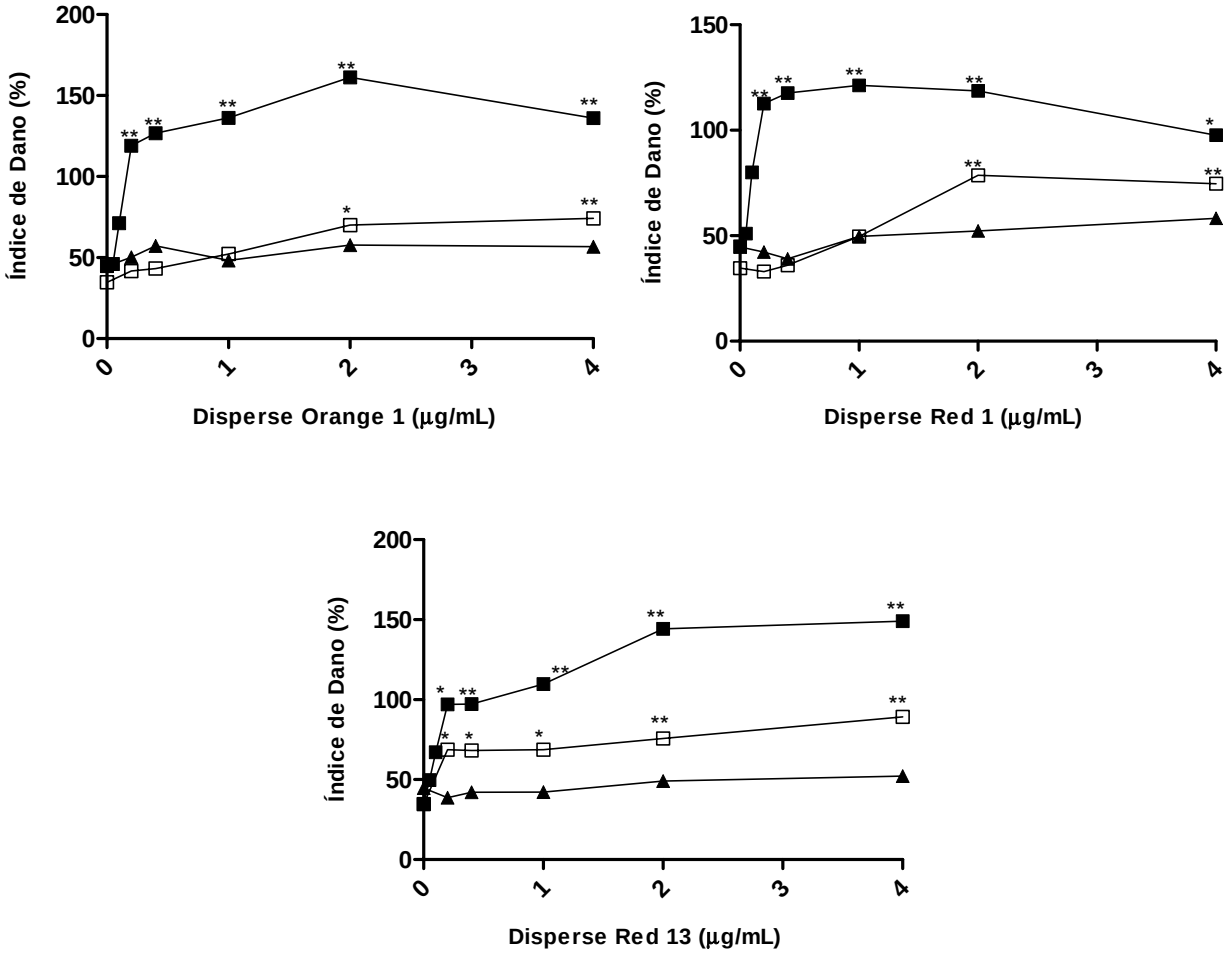


FIGURA 12. Efeito do tratamento de cloração e fotoeletrocatálise na genotoxicidade dos azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13. (■) corantes originais, (□) clorados e (▲) fotoeletrocatalisados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.2 Avaliação da mutagenicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio Salmonella/microssoma

Disperse Orange 1

Para todos os corantes estudados, os dados brutos gerados nesse ensaio se encontram no Apêndice A.

Observando a Figura 13, percebe-se que a cloração diminuiu em 3 vezes a potência mutagênica desse corante quando testado pela linhagem YG1041 na ausência de S9 (Figuras 13 a e b). Na presença desse reagente, a potência foi reduzida em aproximadamente 5 vezes após o tratamento por cloração. Com a linhagem TA98, na qual se observa as menores respostas tanto para o corante original quanto para o tratado, a cloração aumentou a potência mutagênica em cerca de 3 vezes tanto na ausência quanto na presença de S9 (Figuras 13 a e b). A fotoeletrocatálise removeu completamente a mutagenicidade apresentada pelo corante original nas condições testadas (Figura 13 c).

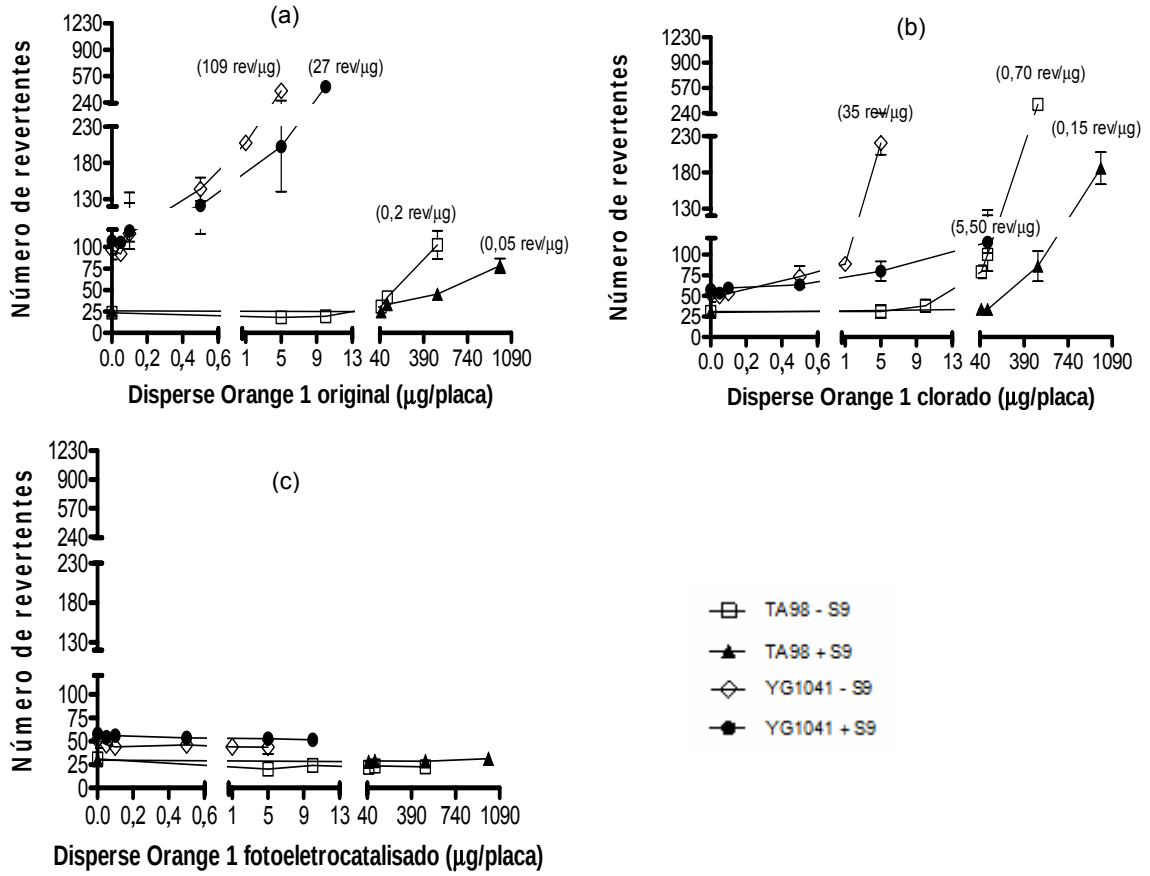


FIGURA 13. Resposta mutagênica do corante Disperse Orange 1 (Ferraz et al., 2011) original e tratado para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência e presença de S9. Os números entre parênteses foram gerados como valores da inclinação da reta, de acordo com o modelo de Bernstein et al. (1982) e representa a potência do composto. As linhas que não possuem esses números entre parênteses representam amostra negativa.

Disperse Red 1

Para esse corante, como pode ser observado na Figura 14, a cloração diminuiu a mutagenicidade apresentada pelo corante original em aproximadamente 2 vezes com a linhagem YG1041 na ausência e presença de S9 (Figuras 14 a e b). Assim como para o corante Disperse Orange 1, a cloração do corante Disperse Red 1 gerou produtos mais mutagênicos para a linhagem TA98, com a potência mutagênica aumentando em 2,5 vezes na ausência de S9 e 2 vezes na presença deste (Figuras 14 a e b). Para esse corante a fotoeletrocatálise também removeu toda a mutagenicidade apresentada pelo composto original (Figura 14 c).

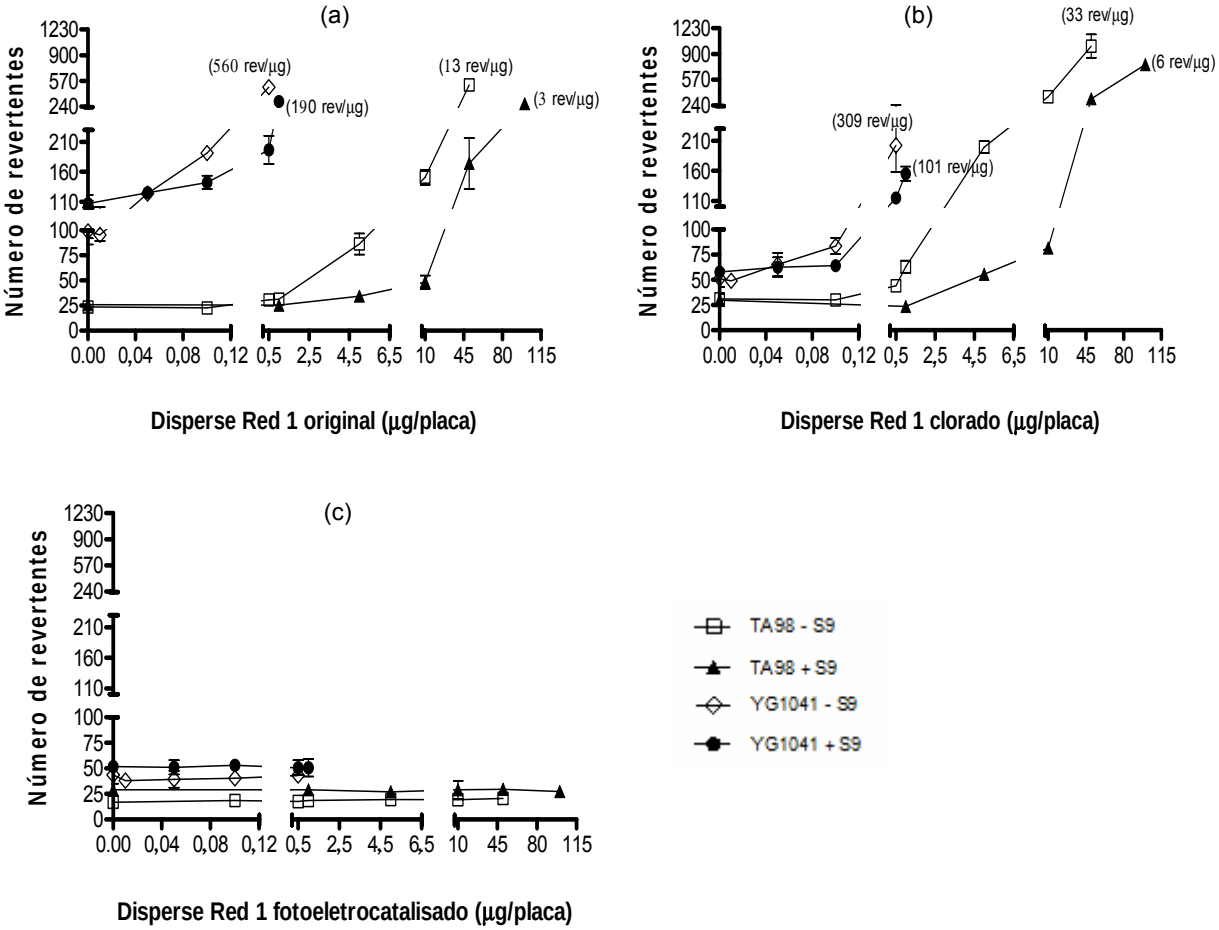


FIGURA 14. Resposta mutagênica do corante Disperse Red 1 (Ferraz et al., 2010) original e tratado para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência e presença de S9. Os números entre parênteses foram gerados como valores da inclinação da reta, de acordo com o modelo de Bernstein et al. (1982) e representa a potência do composto. As linhas que não possuem esses números entre parênteses representam amostra negativa.

Corante Disperse Red 13

Assim como os dois corantes anteriores, a cloração reduziu a mutagenicidade desse composto para a linhagem YG1041, com a potência mutagênica reduzida em aproximadamente 3 vezes na ausência de S9 e 2,5 vezes na presença desse reagente (Figuras 15 a e b). Ao contrário do que foi observado com os corantes anteriores, a cloração gerou produtos que foram menos mutagênicos para a linhagem TA98, com a potência mutagênica sendo reduzida em 2 vezes na ausência de S9. Entretanto, a cloração originou algum produto que passou apresentar mutagenicidade na presença desse reagente, o que não se observou no corante original, do qual a ativação metabólica removeu a mutagenicidade (Figuras 15 a e b). A fotoeletrocatálise, assim como para os dois corantes anteriores, removeu completamente a mutagenicidade encontrada no composto original, como pode ser visto na Figura 15 c.

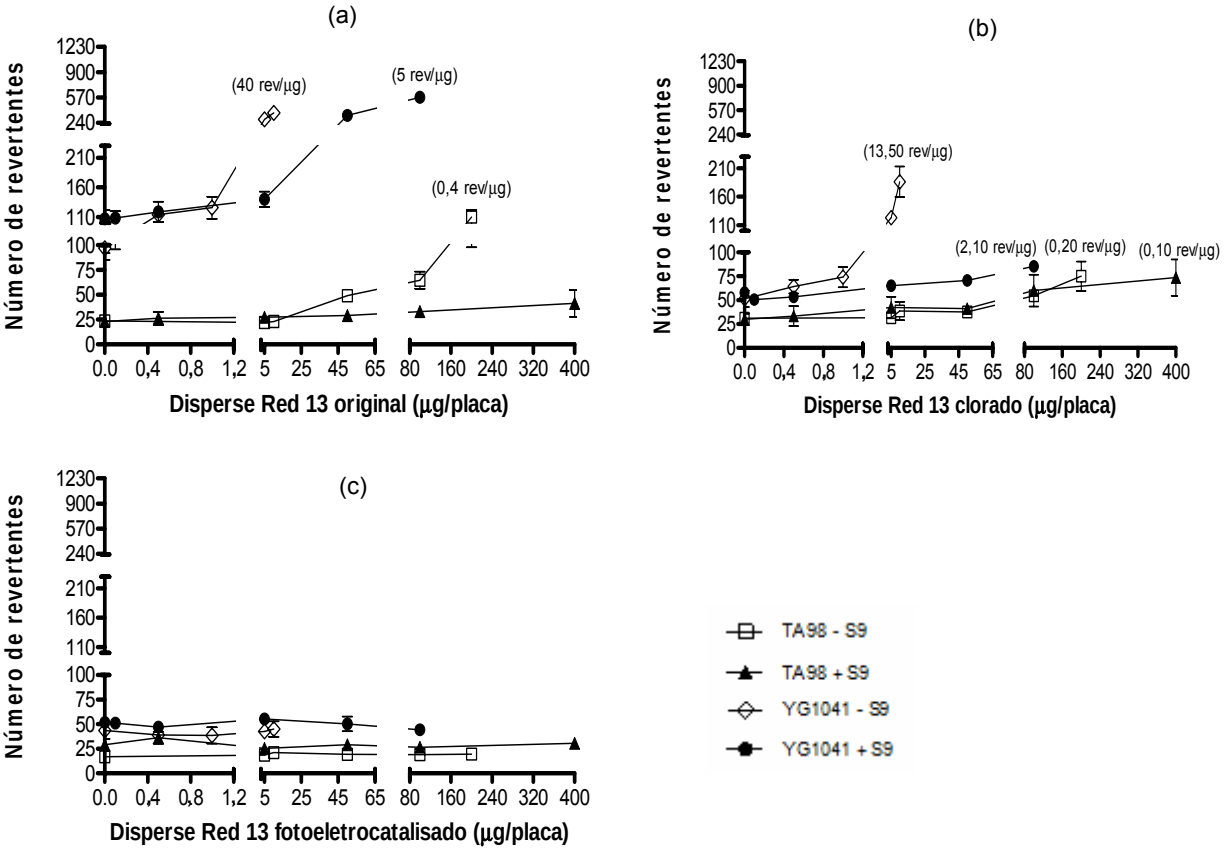


FIGURA 15. Resposta mutagênica do corante Disperse Red 13 original (Ferraz et al., 2010) e tratado para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência e presença de S9. Os números entre parênteses foram gerados como valores da inclinação da reta, de acordo com o modelo de Bernstein et al (1982) e representa a potência do composto. As linhas que não possuem esses números entre parênteses representam amostra negativa.

4.3 Avaliação da citotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio com anexina V

Disperse Orange 1

Este corante foi o único dos três testados que, quando original induziu apoptose nas células HepG2 usando o ensaio com anexina V, após 72 horas de incubação. A Figura 16 mostra este efeito nas células com 24, 48 e 72 horas de incubação.

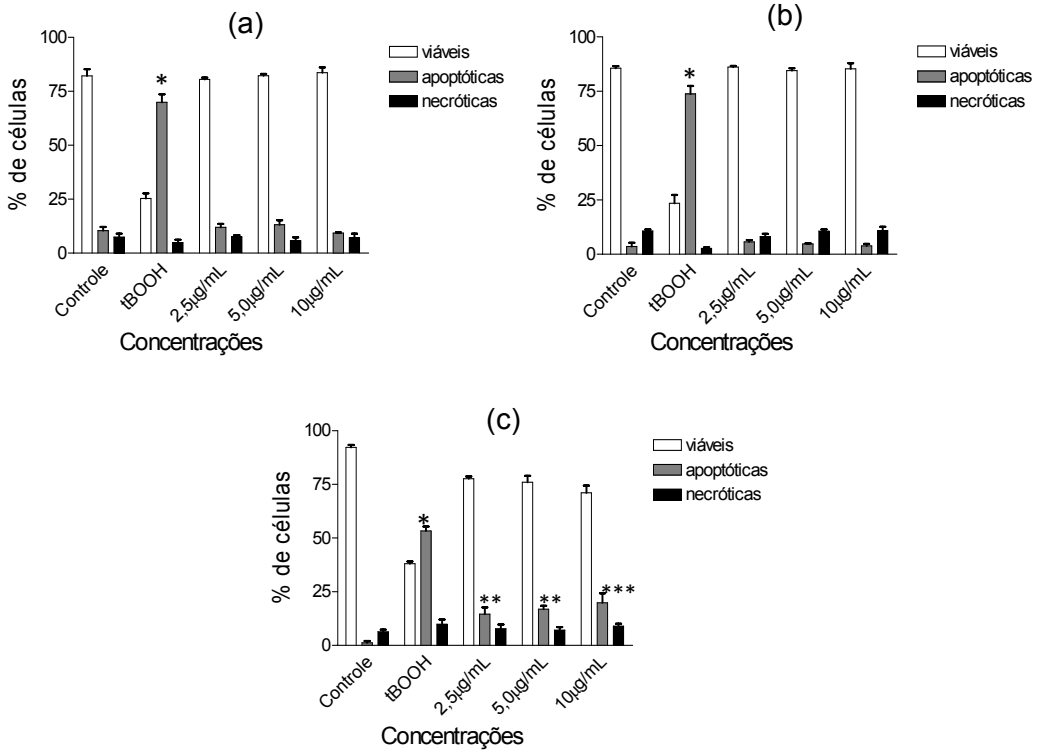


FIGURA 16. Efeito do corante Disperse Orange 1 original nas viabilidade das células HepG2 com 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido. * p<0,001; **p<0,05; ***p<0,01

Entretanto, após o tratamento, tanto por cloração quanto por fotoeletrocatálise, esse corante não mais induziu citotoxicidade em células HepG2. Uma vez que esse efeito só foi observado após 72 horas de incubação, essa mesma condição foi usada para os corantes tratados. As Figuras 17 e 18 mostram o efeito da cloração e fotoeletrocatálise na remoção da citotoxicidade apresentada pelo corante original.

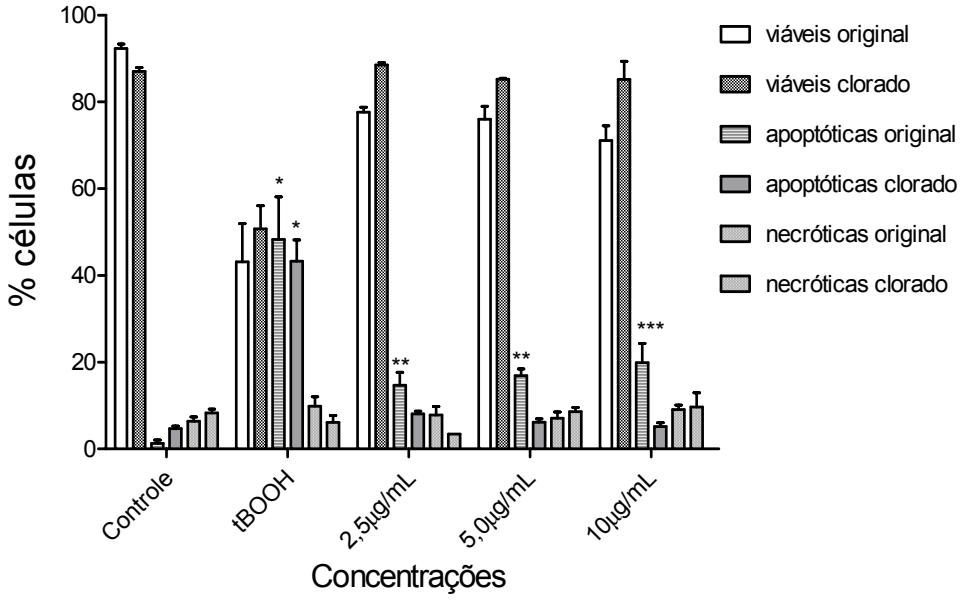


FIGURA 17. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Orange 1 original e clorado com 72 horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido. *p<0,001; **p<0,05; ***p<0,01

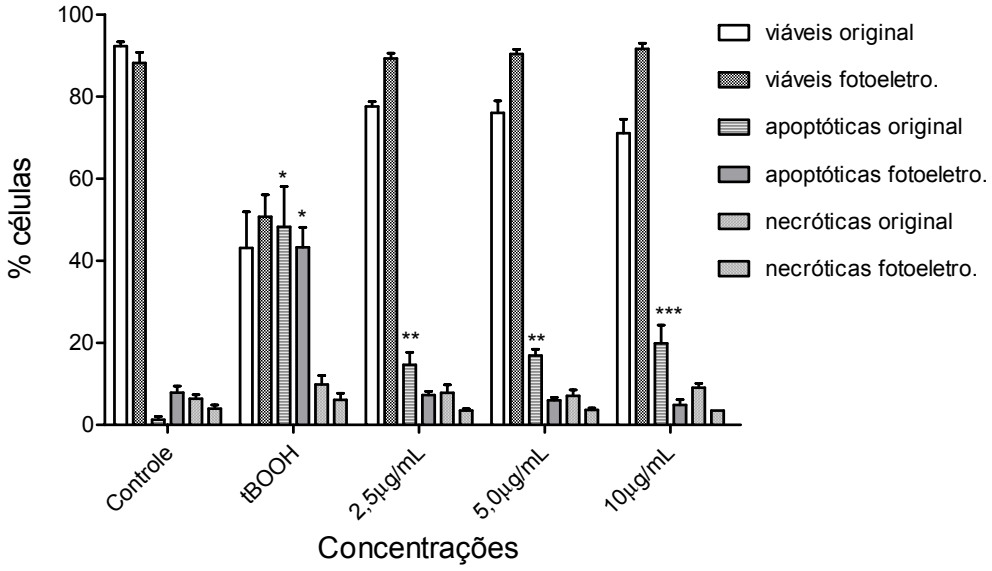


FIGURA 18. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Orange 1 original e fotoeletrocatalisado com 72 horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido. *p<0,001; **p<0,05; ***p<0,01

Disperse Red 1

Diferentemente do corante Disperse Orange 1, esse corante não induziu apoptose nas concentrações testadas em nenhum dos tempos de incubação. A Figura 19 mostra esse efeito com 24, 48 e 72 horas de incubação.

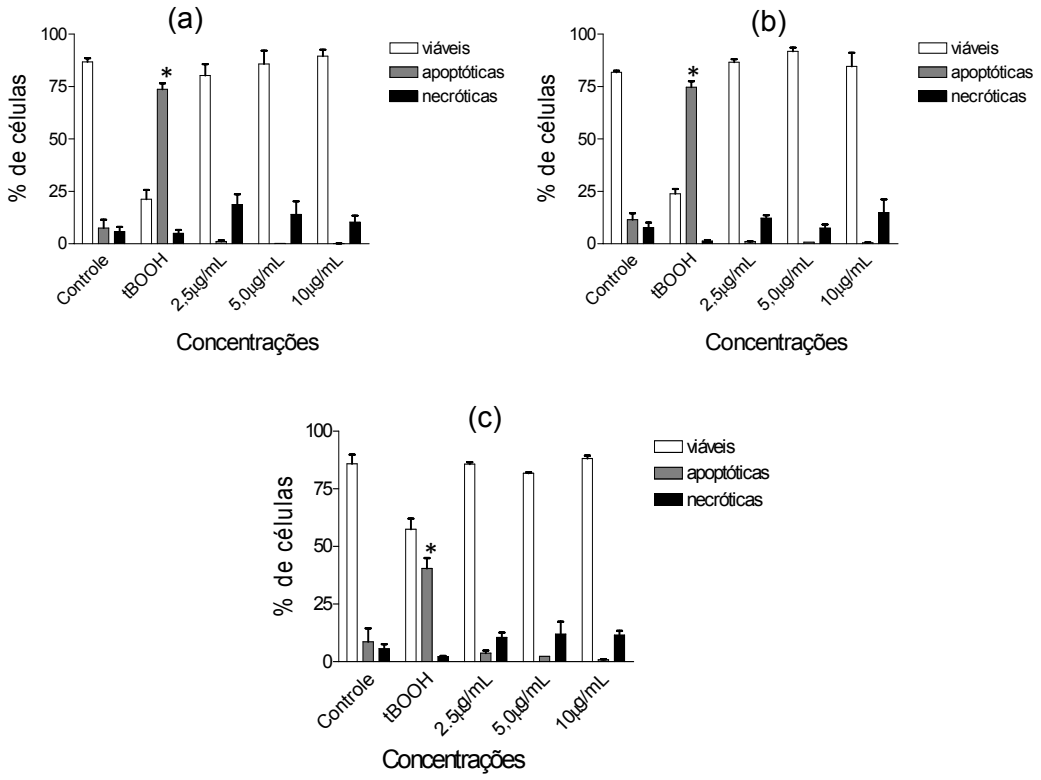


FIGURA 19. Efeito do corante Disperse Red 1 original na viabilidade das células HepG2 com 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido.* p<0,001

Esse comportamento permaneceu após os tratamentos por cloração e fotoeletrocatálise, como mostrado nas Figuras 20 e 21.

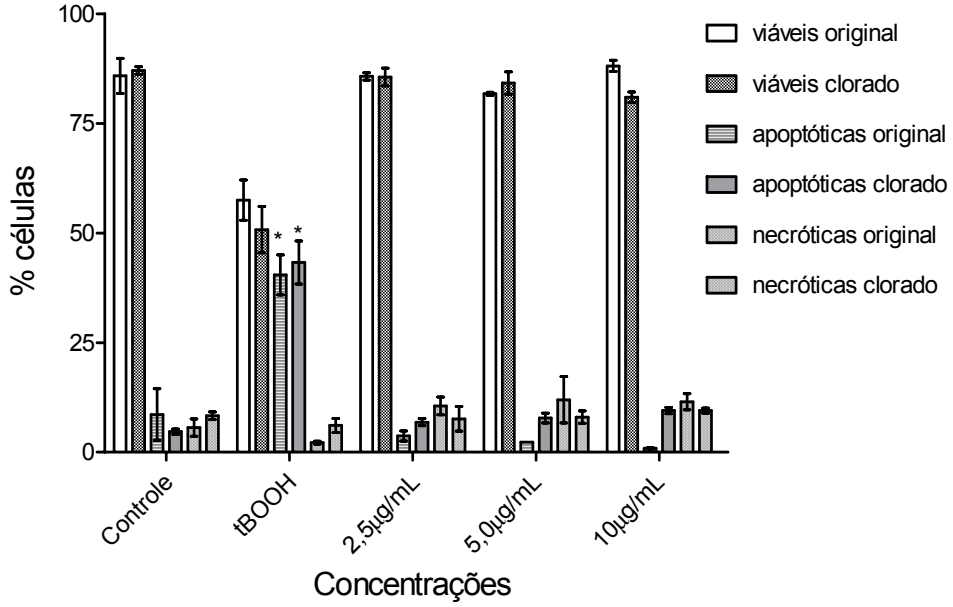


FIGURA 20. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 1 original e clorado com 72 horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido. *p<0,001.

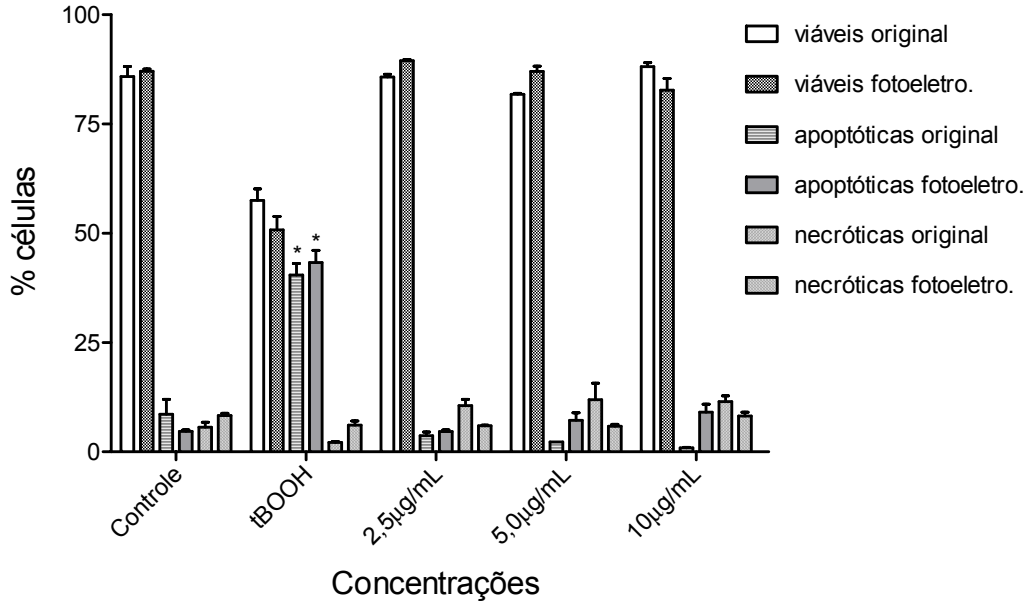


FIGURA 21. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 1 original e fotoeletrocatalisado com 72 horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido. *p<0,001.

Disperse Red 13

Assim como o corante Disperse Red 1, este corante não induziu morte celular em células HepG2 em nenhum dos tempos de incubação testados pelo ensaio de anexina V. A Figura 22 ilustra esse comportamento com os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

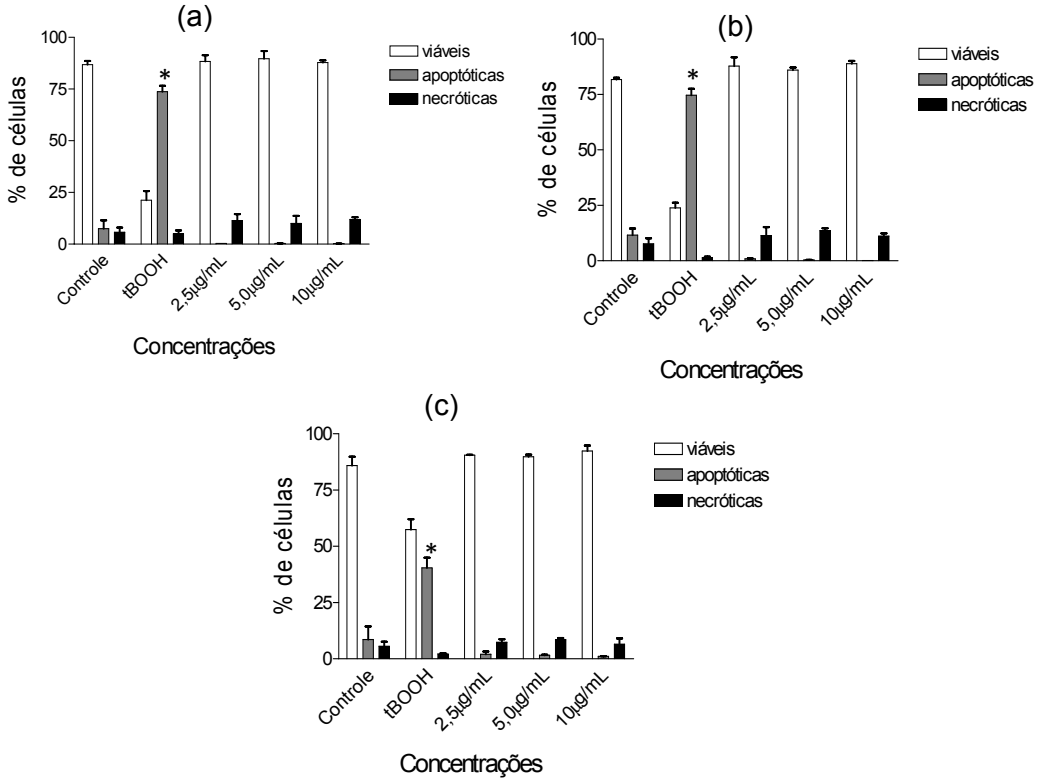


FIGURA 22. Efeito do corante Disperse Red 13 original na viabilidade das células HepG2 com 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido.
* p<0,001

Assim como o corante anterior, o corante Disperse Red 13 manteve a mesma resposta para o ensaio com anexina V depois de clorado e fotoeletrocatalisado (Figuras 23 e 24).

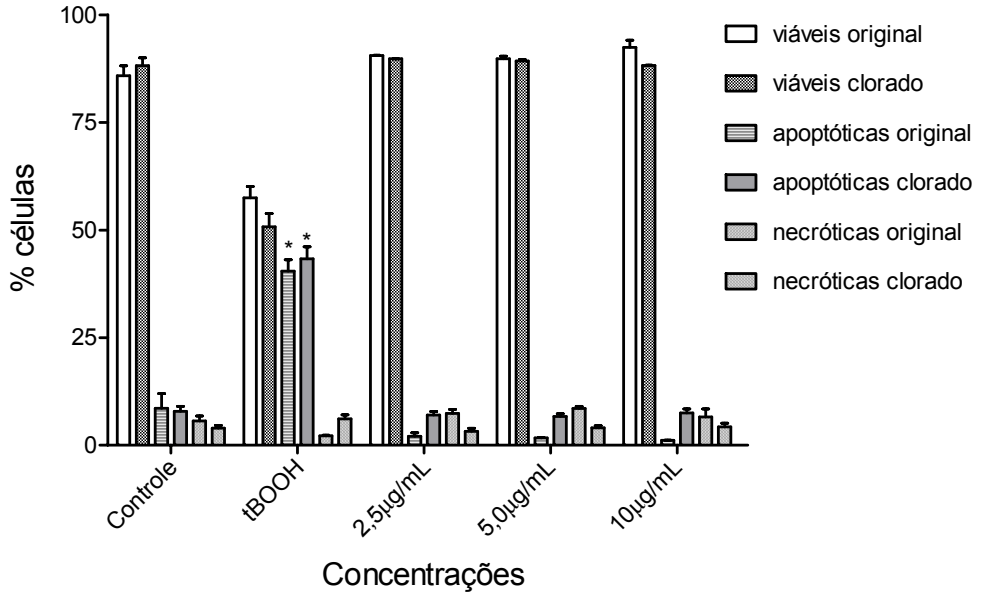


FIGURA 23. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 13 original e clorado com 72 horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido. *p<0,001

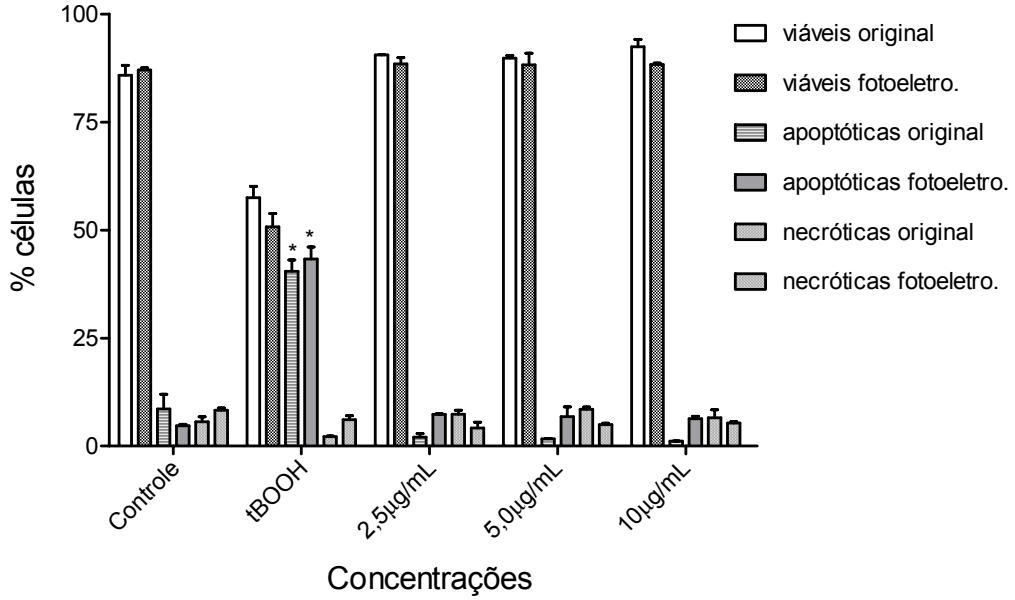


FIGURA 24. Comparação do efeito citotóxico em células HepG2 do corante Disperse Red 13 original e fotoeletrocatalisado com 72 horas de incubação. tBOOH: tertbutil hidroperóxido. *p<0,001.

4.4 Avaliação da ecotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio com Daphnia similis

A tabela 6 mostra os valores de EC50 gerados pelo programa Trimmed Spearman-Karber para os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 originais e tratados utilizando o ensaio com *Daphnia similis.*

TABELA 6. Valores de EC50 gerados pelo programa Trimmed Spearman-Karber para os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 originais e tratados utilizando o ensaio com *Daphnia similis.*

Corante	EC50 (mg/L)	Intervalo de confiança
Disperse Orange 1		
Original	-	-
Clorado	-	-
Fotoeletrocatalisado	-	-
Disperse Red 1		
Original	1,12	0,67 – 1,87
Clorado	5,34	2,74 – 10,40
Fotoeletrocatalisado	2,82	2,25 – 3,53
Disperse Red 13		
Original	0,78	0,45 – 1,35
Clorado	2,24	1,55 – 3,23
Fotoeletrocatalisado	3,98	2,80 – 5,65

-: não tóxico
Controle positivo KCl, valor de EC50 na carta de sensibilidade no momento do ensaio: 792.17 mg/L

Disperse Orange 1

Este corante foi o único entre os corantes testados que não provocou significante imobilização das daphnias em nenhuma condição testada.

Disperse Red 1

Esse corante teve efeito ecotóxico maior no seu estado original (EC50 1,12 mg/L) seguido de seu estado fotoeletrocatalisado, no qual o valor de EC50 foi aumentado cerca de 2,5 vezes, passando de 1,12 para 2,82 mg/L. A cloração foi o tratamento que gerou produtos menos tóxicos para *Daphnia similis*, com o valor de EC50 aumentado cerca de 4,5 vezes em relação ao corante original, passando de 1,12 para 5,34 mg/L, como pode ser observado na Tabela 6.

Disperse Red 13

Assim como o corante Disperse Red 1, esse corante apresentou maior efeito ecotóxico no seu estado original (EC50 0,78 mg/L). Entretanto, ao contrário do que

se observou para o Disperse Red 1, após a cloração esse composto tornou-se mais tóxico para *Daphnia similis* do que quando fotoeletrocatalisado, com o valor de EC50 aumentando aproximadamente 3 vezes, passando de 0,78 para 2,24 mg/L. Já a fotoeletrocatálise aumentou o valor de EC50 em 5 vezes em relação ao corante original, passando de 0,78 para 3,98 mg/L, conforme mostra na Tabela 6.

4.5 Avaliação da ecotoxicidade dos corantes originais e tratados utilizando o ensaio Microtox®

A Tabela 7 mostra os valores de EC20 gerados no ensaio Microtox® para os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 originais e tratados.

TABELA 7. Valores de EC20 gerados pelo programa Microtox Omni para os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 originais e tratados utilizando o ensaio Microtox® .

Corante	EC20 (mg/L)	Intervalo de confiança
Disperse Orange 1		
Original	-	-
Clorado	5,73	5,18 – 6,35
Fotoeletrocatalisado	-	-
Disperse Red 1		
Original	1,96	1,02 – 3,74
Clorado	2,25	1,46 – 3,49
Fotoeletrocatalisado	7,96	6,23 – 10,18
Disperse Red 13		
Original	-	-
Clorado	9,46	4,66 – 19,19
Fotoeletrocatalisado	30,90	9,00 – 106,00

-: não tóxico
Controle positivo ($ZnSO_4.7H_2O$) 100 mg/L: EC50: 3,04 (1,95 – 4,75)

Disperse Orange 1

Assim como para o ensaio com *Daphnia similis*, esse corante no seu estado original e após tratamento por fotoeletrocatálise também não apresentou toxicidade para *Vibrio fischeri*; entretanto, após tratamento por cloração esse composto se torna tóxico para o referido organismo (EC20 5,73 mg/L).

Disperse Red 1

Este corante provocou inibição na emissão de luz pelo *Vibrio fischeri* em todas as condições testadas, sendo que na sua forma original ele foi mais tóxico

(EC20 1,96 mg/L), seguido pela sua forma clorada, que aumentou o valor de EC20 em 1,15 vezes, indo de 1,96 para 2,25 mg/L e fotoeletrocatalisada que provocou um aumento no valor de EC20 de 4 vezes em relação ao corante original, passando de 1,96 para 7,96 mg/L, como ilustra a Tabela 7.

Disperse Red 13

Este corante só apresentou toxicidade para *Vibrio fischeri* após os tratamentos, sendo que após a cloração seu efeito ecotóxico foi maior, com valor de EC20 3 vezes menor (9,46 mg/L) do que após a fotoeletrocatálise (EC20 30,9 mg/L) como mostra a Tabela 7.

4.6 Avaliação da citotoxicidade dos corantes originais

4.6.1 Ensaio de MTT e lactato em condrócitos bovinos

4.6.1.1 Ensaio de MTT

Conforme dito anteriormente os corantes não atravessaram as esferas de alginato, o que inviabilizou os ensaios em 3D com condrócitos. Sendo assim, os resultados aqui apresentados foram gerados em cultivo em monocamadas.

Pela Figura 25 pode-se observar que o corante Disperse Red 13 (Figura 25 c) foi o que causou maior toxicidade aos condrócitos, reduzindo a atividade mitocondrial na maior concentração testada (40 µg/mL) para 60%, 42% e 43% após 24, 48 e 72 horas respectivamente. Já o corante Disperse Orange 1 (Figura 25 a) teve uma menor influência na atividade mitocondrial dos condrócitos, reduzindo-a para 86% após 72 horas de exposição. Ao contrário dos dois corantes anteriores, o corante Disperse Red 1 não causou nenhum efeito significativo na atividade mitocondrial dos condrócitos (Figura 25 b).

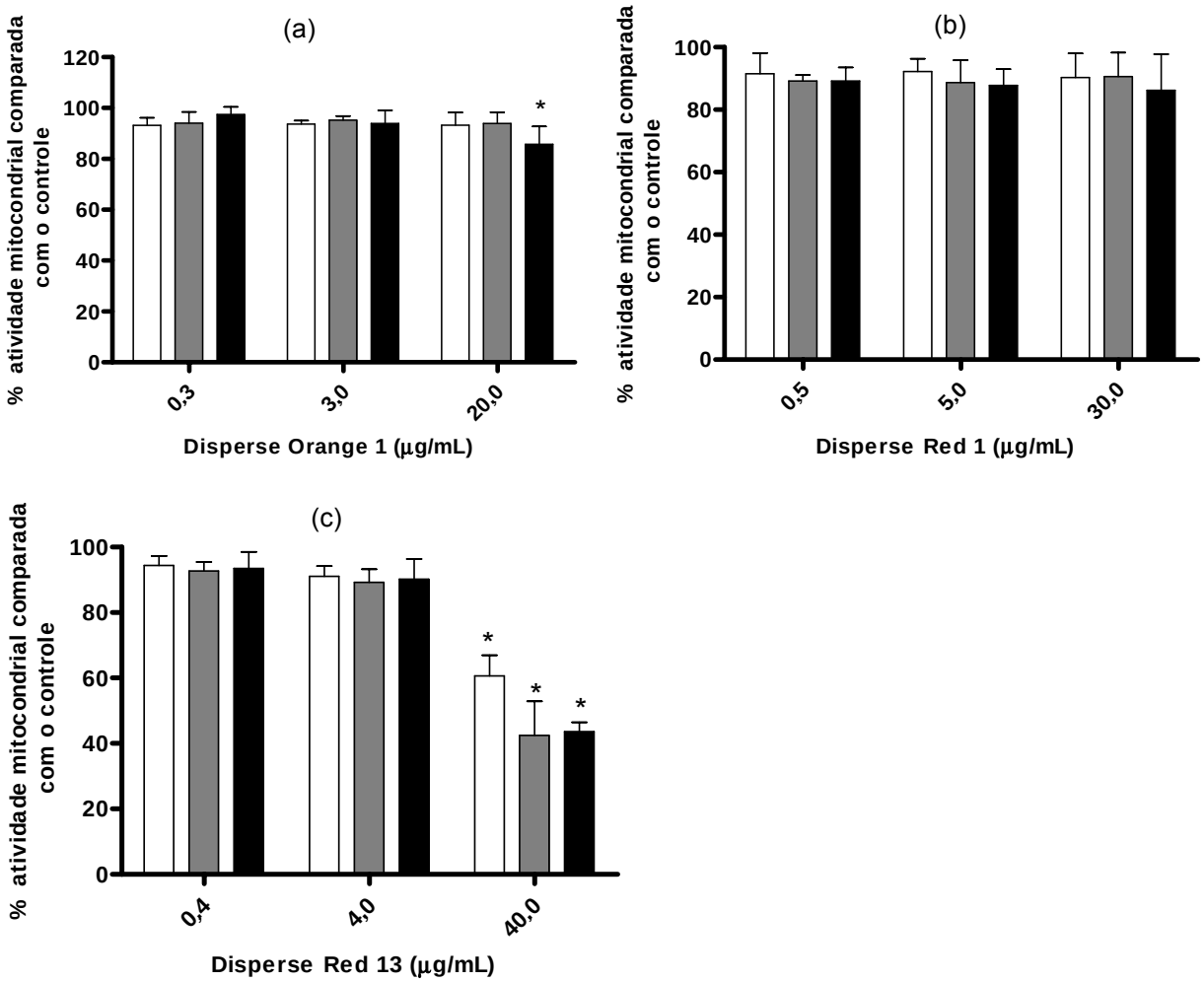


FIGURA 25. Efeito dos corantes Disperse Orange 1 (a), Disperse Red 1 (b) e Disperse Red 13 (c) na atividade mitocondrial de condrócitos cultivados em monocamadas após 24(▭), 48 (▬) e 72 horas (▬) de exposição. * $p < 0.05$.

4.6.1.2 Ensaio do lactato

A Figura 26 mostra a curva de calibração do padrão lactato (Figura 26 a) e a influência dos corantes na produção desse produto de metabolismo de glicose (Figuras 26 b, c e d). Pelos gráficos pode-se notar que somente o corante Disperse Red 13 diminuiu significativamente a produção de lactato pelos condrócitos (Figura 26 d). Tal efeito ocorreu após 24, 48 e 72 horas, com a produção de lactato reduzida em 3,5, 3,3 e 5,5 vezes, respectivamente, com a maior concentração testada (40 µg/mL).

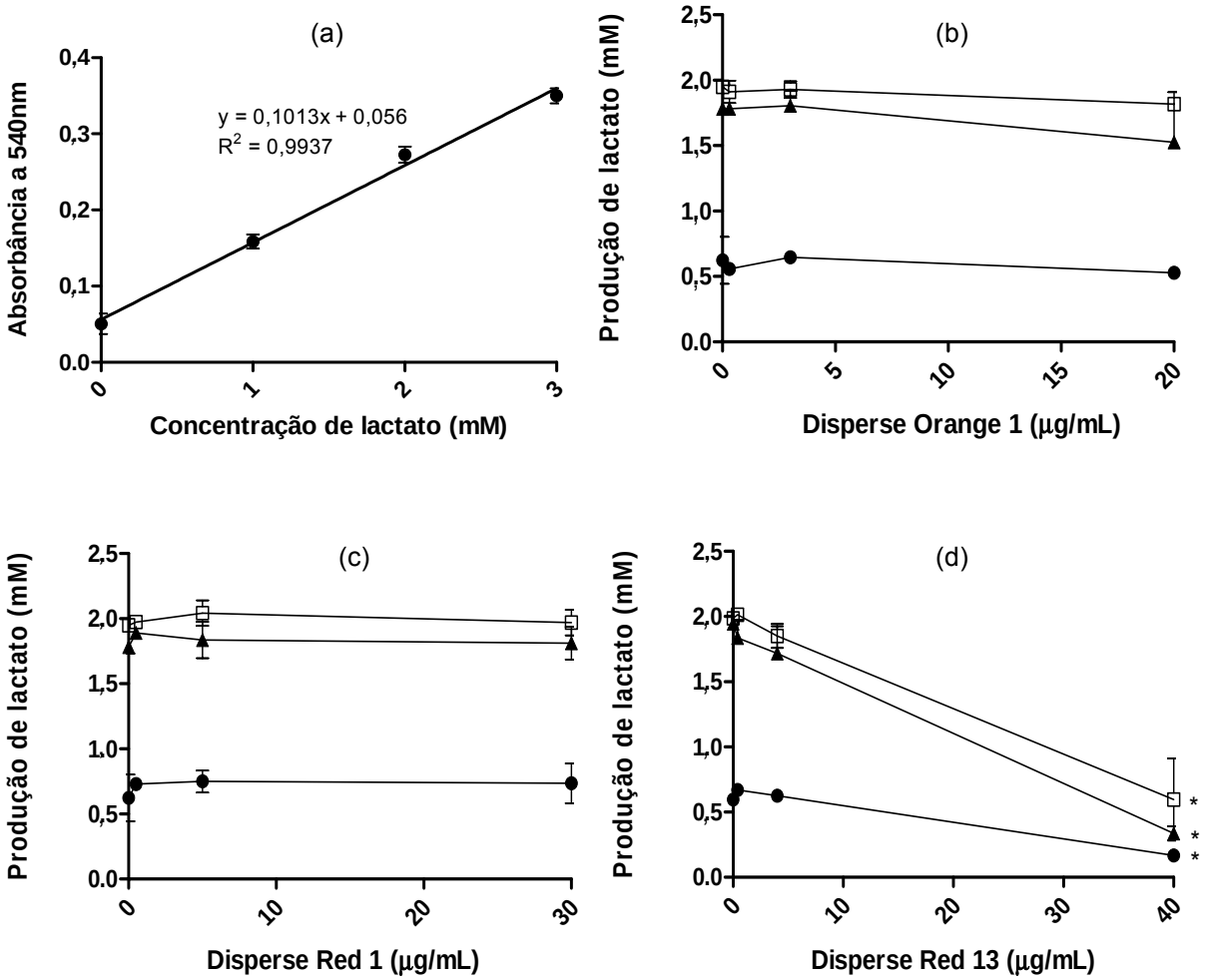


FIGURA 26. Curva de calibração do padrão lactato (a) e efeito dos corantes Disperse Orange 1 (b), Disperse Red 1 (c) e Disperse Red 13 (d) na produção de lactato pelos condrócitos cultivados em monocamadas após 24(—●—), 48 (—□—) e 72 horas (—▲—) de exposição.
* $p < 0.05$.

4.7 Caracterização das células HepG2 cultivadas em monocamadas, 3D em cultura estática e 3D em perfusão

4.7.1 Viabilidade

Pela Figura 27a pode-se observar que a viabilidade da cultura em monocamadas foi maior do que os outros dois tipos de cultura até o 11º dia de cultivo, com cerca de 90% de células viáveis, reduzindo para 12% no 14º dia de cultura. A cultura estática em 3D veio logo depois, com 80% de viabilidade que se

manteve constante até o 7º dia. A partir daí a houve um aumento na viabilidade celular, que chegou a aproximadamente 98% no 14º dia de cultura. Na cultura em perfusão a viabilidade reduziu de 81%, no 1º dia de cultura, para 62% no 4º dia e a partir daí a porcentagem de células viáveis voltou a subir, atingindo 94% no 14º dia de cultura. Ao contrário do que se observou na cultura em 3D, no 14º dia de cultura o cultivo em monocamadas apresentou uma queda significativa na viabilidade, chegando a 12% de células viáveis. Tal comportamento pode ser explicado pela Figura 27b, que mostra o número total de células nos três tipos de cultura durante os 14 dias de estudo.

No 14º dia em cultura o número de células em monocamadas (12,85 x 10^5 células/poço) foi aproximadamente 3 vezes maior do que o número de células em 3D (4,02 x 10^5 células/poço em cultura estática e 5,07 x 10^5 células/poço na perfusão). Assim, a depleção de nutrientes no meio pode explicar a queda na viabilidade celular apresentada.

A Figura 27b mostra que a proliferação celular em monocamadas foi consideravelmente maior do quem em 3D, com o número de células aumentando em aproximadamente 3 vezes a cada 3 dias até o 11º dia em cultura. Segundo Lan, Mroczka e Starly (2010), tal fato pode ser atribuído à falta de adesão entre as células HepG2 e a estrutura de alginato. Os autores afirmam que embora o alginato seja altamente poroso, provavelmente as células se aglomeram dentro da matriz, não aderindo às cadeias de alginato. Uma vez que essas células são “acoragem dependente”, a adesão inicial à estrutura da matriz é um estágio crítico, visto que precede a proliferação e distribuição das células.

Na cultura estática em 3D o número de células aumentou até o 7º dia e a partir daí permaneceu constante, com cerca de 4 x 10^5 células/poço. A cultura em perfusão apresentou número de células semelhante à cultura estática até o 4º dia de cultivo, a partir daí o número de células em perfusão ficou menor do que em cultura estática, voltando a crescer após o 11º dia, sendo que no 14º dia o número de células em perfusão tinha dobrado em relação ao 11º dia. Os dois tipos de cultura tinha número celular bastante semelhante no 14º dia em cultura.

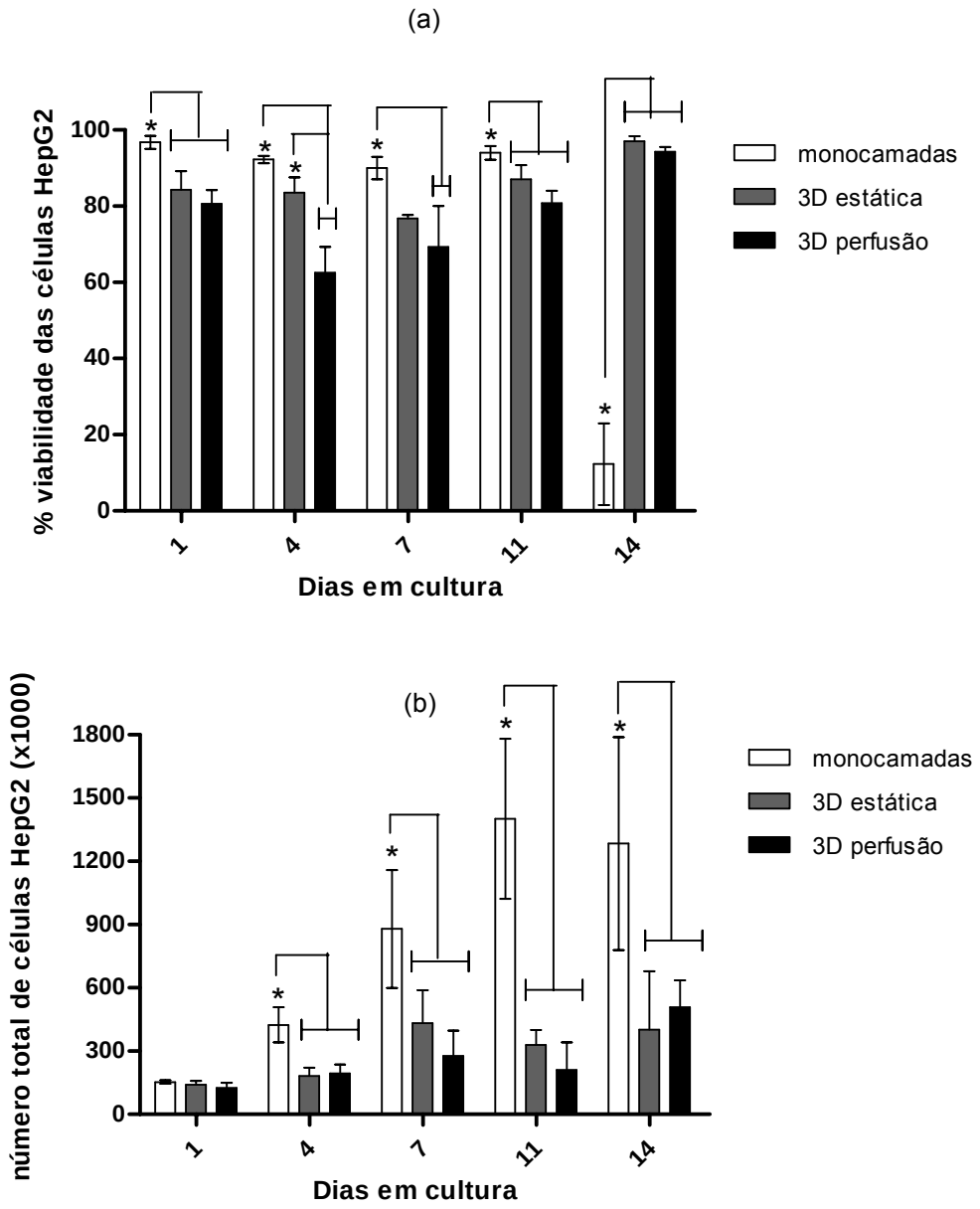


FIGURA 27. Viabilidade (a) e número total de células HepG2 (b) após 1, 4, 7, 11 e 14 dias de cultura em monocamadas, 3D em cultura estática e 3D em perfusão. * $p < 0,05$.

4.7.2 Morfologia –actina filamentosa (F-actina)

F-actina, forma filamentosa da proteína actina, compõe o citoesqueleto, auxiliando na manutenção da forma celular e da arquitetura do tecido (STRICKER, FALZONE, GARDEL, 2010, CHATURVEDI, SREEDHAR, 2010).

A Figura 28 mostra F-actina (em vermelho) e o núcleo (em azul) das células HepG2 no 7º dia de cultivo em monocamadas (a) e em 3D (b). Pecebe-se a diferença na morfologia da cultura em monocamadas, na qual os filamentos de F-actina se espalharam e aderiram ao fundo do frasco, e da cultura em 3D, onde os

filamentos dessa proteína se encontram entre as células, arranjadas numa forma esférica. Essas imagens confirmam que, quando cultivadas em 3D, as células reproduzem de maneira mais fidedigna a arquitetura do tecido *in vivo*.

(a) (b)

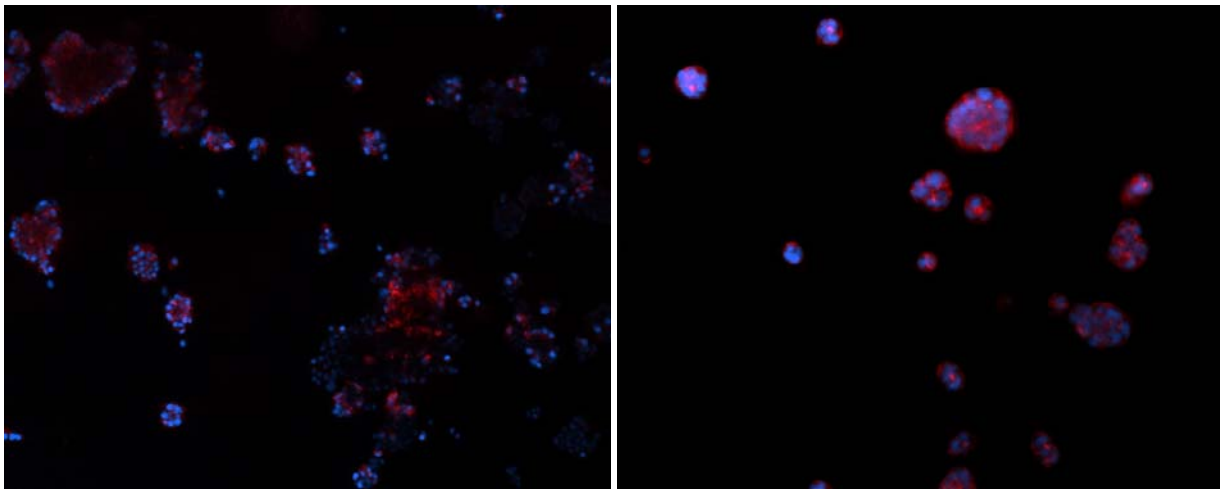


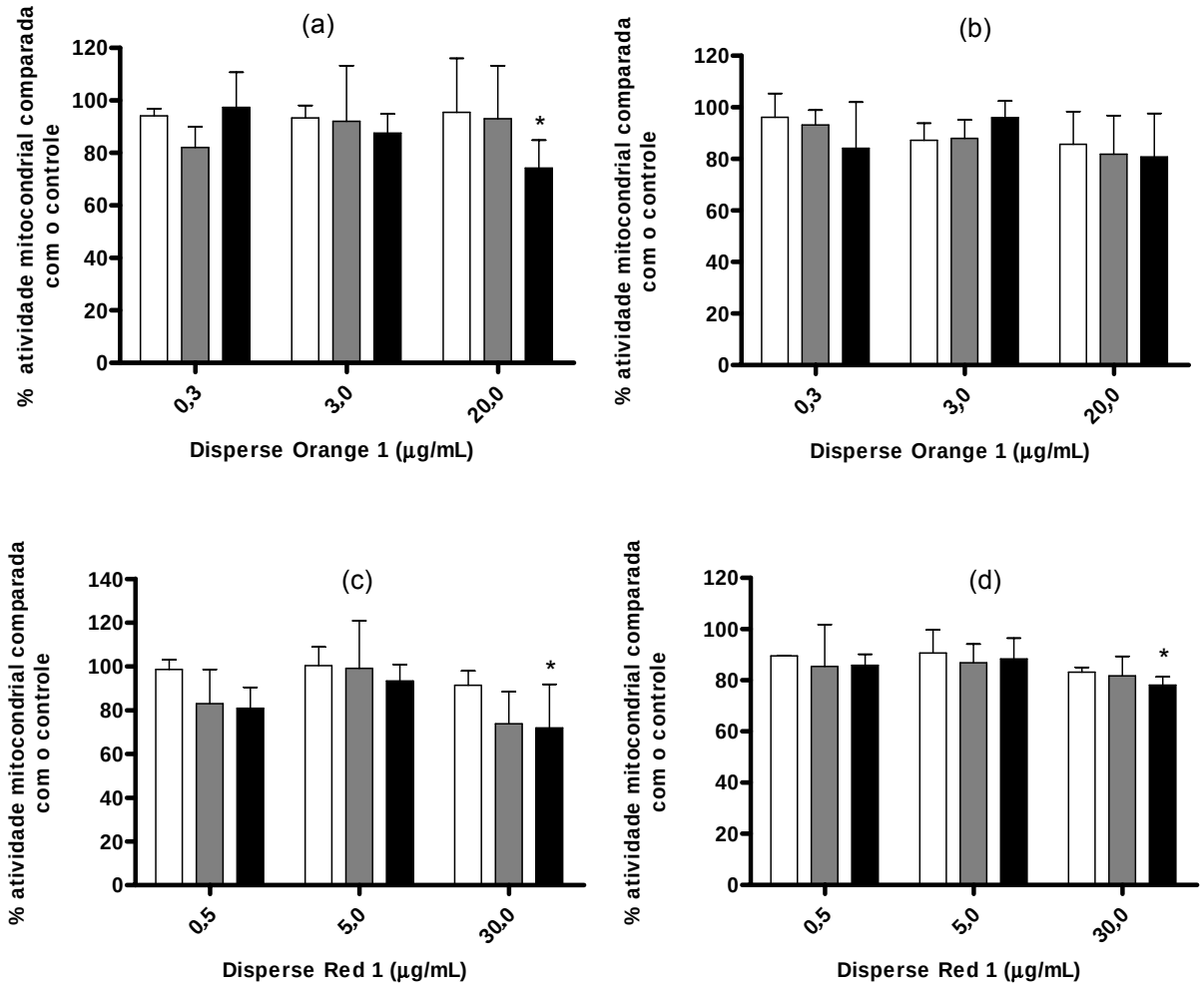
FIGURA 28. Micrografia dos filamentos de F-actina formados no 7º dia de cultura das células HepG2 cultivadas em monocamadas (x10) (a) e em 3D (x20) (b).

4.8 Avaliação da citotoxicidade dos corantes originais utilizando os ensaios MTT e CCK-8 em células HepG2 cultivadas em monocamadas e em 3D

4.8.1 Ensaio MTT

Na cultura em monocamadas os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 diminuiu a atividade mitocondrial para 74% e 72%, respectivamente após 72 horas de exposição nas mais altas concentrações testadas (20 µg/mL para o Disperse Orange 1 e 30 µg/mL para o Disperse Red 1) (Figura 29a e 29c). Entretanto, na cultura em 3D, somente o corante Disperse Red 1 mostrou o mesmo comportamento, diminuindo a atividade mitocondrial para cerca de 78% (Figura 29d). Nas mesmas condições o corante Disperse Orange 1 não exerceu efeito significativo na atividade mitocondrial das células HepG2 (Figura 29b). Por outro lado, o corante Disperse Red 13 afetou a atividade mitocondrial de maneira mais pronunciada, reduzindo-a para 68%, 43% e 34% após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente, nas células cultivadas em monocamadas na maior concentração testada (40 µg/mL) (Figura 29e); na cultura em 3D os resultados foram bastante semelhantes, com a atividade mitocondrial reduzida para 77%, 64% e 36%

após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente, na maior concentração testada (40 µg/mL) (Figura 29f). O efeito do corante Disperse Red 13 na atividade mitocondrial das células HepG2 também foi avaliado em cultura em 3D em perfusão (Figura 29g), entretanto, como pode ser observado, os dados não estão consistentes, visto que além de desvios altos, há uma redução na atividade mitocondrial após 24 horas e um aumento após 48 horas. Esse resultado não pôde ser repetido porque a disponibilidade de bombas para a perfusão era limitada. Por esse mesmo motivo somente um corante pôde ser testado em perfusão, e a escolha do Disperse Red 13 se deu devido aos ensaios anteriores utilizando condrócitos, nos quais esse corante se mostrou o mais tóxico dentre os estudados.



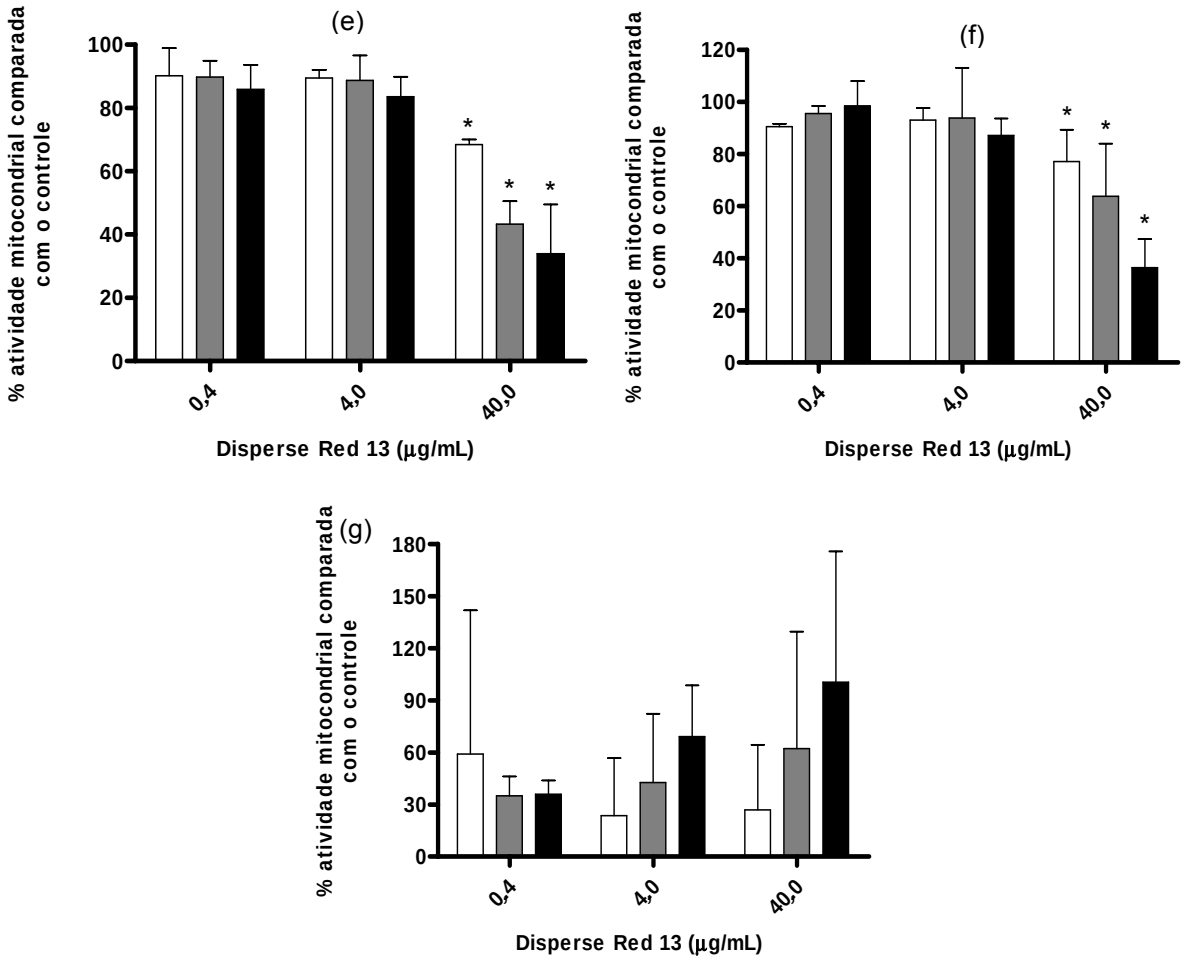


FIGURA 29. Efeito dos corantes Disperse Orange 1 (a e b), Disperse Red 1 (c e d) e Disperse Red 13 (e, f e g) na atividade mitocondrial de células HepG2 cultivadas em monocamadas (a, c e e) em 3D em cultura estática (b, d e f) e em 3D em perfusão (g) após 24(▭), 48 (▬) e 72 horas (■) de exposição. * $p < 0,05$.

4.8.2 Ensaio CCK-8

Os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 não reduziram a atividade de desidrogenase das células HepG2 em nenhuma das condições testadas (Figuras 30a, 30b e 30c, 30d). Ao contrário dos dois corantes anteriores, o corante Disperse Red 13 diminuiu a atividade de desidrogenase para 64% e 67% após 72 horas de exposição em monocamadas e em 3D, respectivamente, na maior concentração testada (40 µg/mL) (Figuras 30e e 30f).

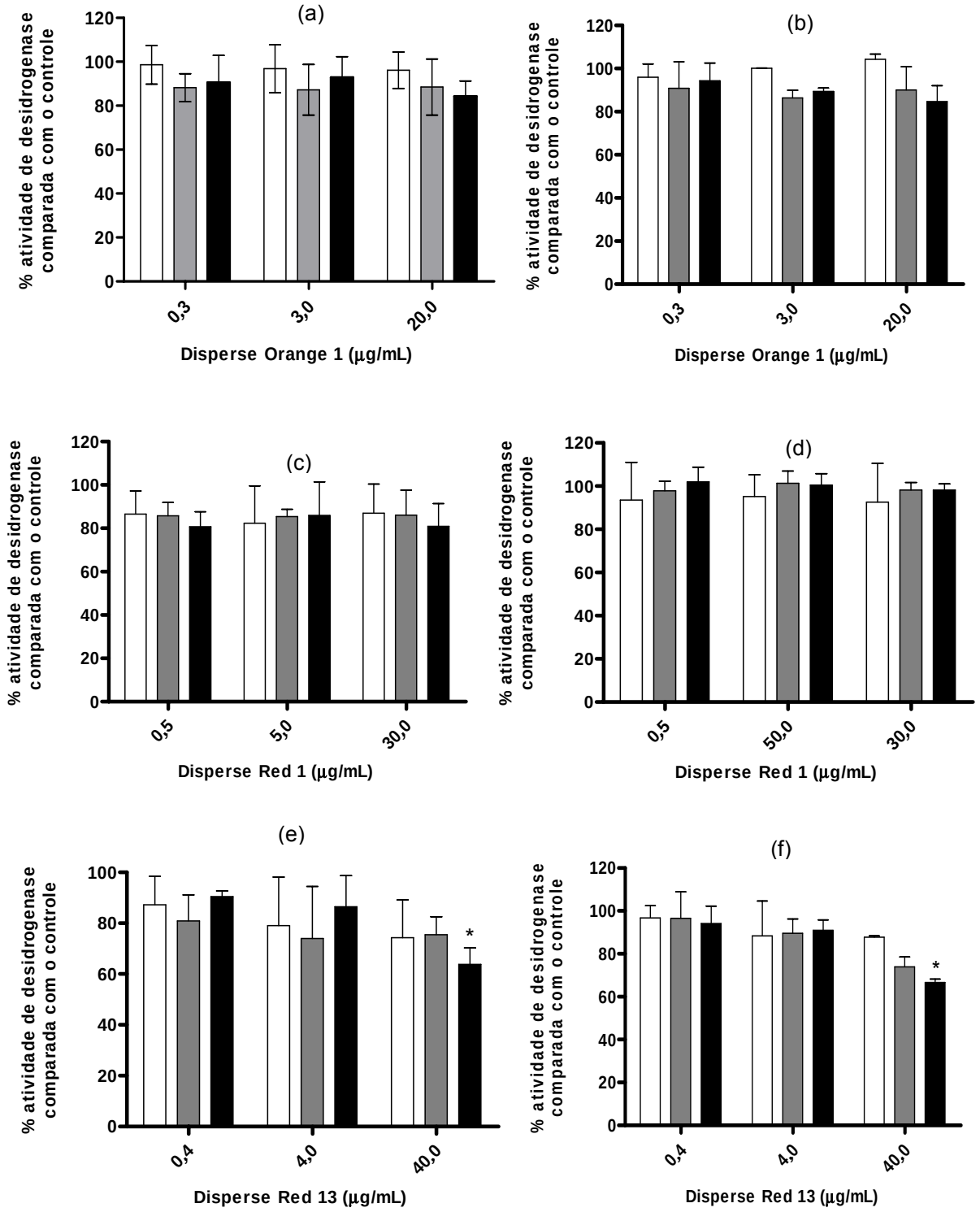


FIGURA 30. Efeito dos corantes Disperse Orange 1 (a e b), Disperse Red 1 (c e d) e Disperse Red 13 (e e f) na atividade de desidrogenase de células HepG2 cultivadas em monocamadas (a, c e e) e em 3D (b, d e f) após 24(▭), 48 (▬) e 72 horas (━) de exposição. * p< 0,05.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 Genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade dos corantes originais Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13

Como mostram as Tabelas 3, 4 e 5 a maioria dos danos provocados pelos corantes originais foram de grau 1. Esse fato mostra que os corantes estudados quebram o DNA, porém não de forma muito drástica. Esse resultado confirma os dados obtidos no ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* já realizado pelo grupo. Nossos resultados mostraram que os corantes são mutagênicos e que o mecanismo principal é o deslocamento do quadro de leitura (FERRAZ et al., 2010, FERRAZ et al., 2011). Provavelmente ocorre a deleção de pares de base do DNA, e estas bases são detectadas no ensaio do cometa. Ainda, os corantes foram considerados como sendo de mutagenicidade fraca a moderada (FERRAZ et al., 2010), de acordo com a classificação de Claxton et al. (1991).

Vários autores publicaram resultados positivos para azo corantes usando o ensaio do cometa. Tsuda et al. (2000) avaliaram 24 azo corantes em 8 órgãos de rato. Dos 24, 17 foram genotóxicos para pelo menos um órgão; 14 e 12 azo compostos induziram dano no DNA do cólon e fígado respectivamente. Em 2007 An. et al. observaram que o azo corante Sudan I induz efeitos genotóxicos em células HepG2 (AN et al., 2007). Tsuboy et al. (2007) detectaram atividade genotóxica do azo corante Disperse Blue 291 em células HepG2.

Pelos resultados apresentados neste trabalho observa-se uma redução no índice de dano nas maiores concentrações para os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 e para o clorado Disperse Red 1. De fato, nessas concentrações, apesar de não se observar diminuição na viabilidade pelo *Trypan Blue*, as lâminas apresentavam células destruídas, provavelmente devido a algum efeito citotóxico apresentado por esses compostos. O mesmo aconteceu no trabalho de Chequer et al. (2009). Os autores avaliaram esses mesmos corantes usando o ensaio de micronúcleos em células HepG2 e linfócitos, e para ambas as células o número de micronúcleos diminuiu embora o *cytokinesis block proliferation index* (CBPI), índice que avalia a citotoxicidade, não tenha sofrido alterações. Porém, os autores relatam a dificuldade de contagem de células durante a análise das lâminas referentes aos tratamentos nas maiores concentrações.

Pelos resultados apresentados no ensaio de citotoxicidade com anexina V, percebe-se que nas condições testadas somente o corante Disperse Orange 1 induziu apoptose, e mesmo assim após 72 horas de incubação. Nenhum dos corantes estudados induziu necrose utilizando esse mesmo ensaio. O fato desse corante ter induzido apoptose, aparentemente o torna menos prejudicial, pois conforme dito anteriormente, a apoptose impede a fixação da mutação.

Um fato intrigante é que no ensaio do cometa, no qual os corantes foram tratados por 4 horas, os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 apresentaram células visualmente destruídas nas concentrações maiores ao se analisar as lâminas, o que diminuiu o índice de dano (Tabelas 3 e 4), uma vez que os nucleóides totalmente destruídos não são contabilizados. Para maior confiabilidade, o ensaio de citotoxicidade com anexina V foi repetido para esses corantes com 4 horas de incubação, que foi o tempo de exposição utilizado no teste do cometa, e também não foi observada citotoxicidade (dados não mostrados). Pode ser que a morte celular observada nas lâminas se deva a outro mecanismo de morte celular, como a autofagia e não apoptose ou necrose.

A autofagia é um processo no qual as células reciclam suas organelas e proteínas. O processo tem início com a formação de vacúolos autofágicos de membranas duplas que contêm enzimas lisossômicas responsáveis pela digestão do material sequestrado. Esse processo pode simplesmente reciclar as organelas e proteínas ou continuar digerindo o conteúdo citoplasmático até a morte celular ou ainda, estimular a apoptose. Além de manter a homeostasia citoplasmática, a autofagia pode ser estimulada em resposta a diferentes situações de *stress* como inanição, mudança no volume celular, *stress* oxidativo, sinalização hormonal, irradiação e tratamento com xenobiótico (MEIJER, CODOGNO, 2004, KRYSKO et al., 2008).

Sendo assim, sugerimos que a morte celular observada nas lâminas das concentrações mais altas no ensaio do cometa se deva à autofagia. Outro fato que nos dá suporte a fazer tal sugestão é que o ensaio de micronúcleos com os mesmos corantes e as mesmas células, realizado no nosso laboratório, apresentava células com vacúolos nas maiores concentrações (dados não mostrados).

Uma vez que só o corante Disperse Orange 1 induziu apoptose, é provável que o anel aromático presente neste corante e ausente nos demais tenha alguma influência na citotoxicidade encontrada.

Pelos resultados obtidos no ensaio de ecotoxicidade com *Daphnia similis* (Tabela 6), pode-se observar que entre os três corantes estudados, no seu estado original, o Disperse Red 13 foi o mais tóxico seguido pelo Disperse Red 1. Já o corante Disperse Orange 1 não apresentou toxicidade para *Daphnia similis* nem no seu estado original nem após tratamento. Analisando os resultados gerados pelo ensaio Microtox® (Tabela 7), nota-se que no seu estado original somente o corante Disperse Red 1 foi tóxico para *Vibrio fischeri* nas condições testadas.

Analisando os dados de citotoxicidade desses corantes em condrócitos através dos ensaios de MTT e lactato, pode-se observar pela Figura 25 que o corante Disperse Red 13 foi o que mais interferiu na atividade mitocondrial dessas células, seguido pelo corante Disperse Orange 1, que teve um efeito consideravelmente menor. Já o corante Disperse Red 1 não alterou a atividade mitocondrial dos condrócitos. A produção de lactato, principal metabólito produzido pelos condrócitos (BOUBRIAK, URBAN, CUI, 2006), foi afetada de maneira bastante semelhante à atividade mitocondrial (Figura 26), com o corante Disperse Red 13 reduzindo a produção desse metabólito a partir de 24 horas de exposição na maior concentração testada. Além disso, o corante Disperse Red 1, que não interferiu na atividade mitocondrial dos condrócitos, também não alterou a produção de lactato por essas células. O corante Disperse Orange 1, por sua vez, reduziu a atividade mitocondrial dos condrócitos, mas não interferiu na produção de lactato após 72 horas de exposição. Possivelmente a produção de lactato não foi afetada significativamente porque este corante não teve um efeito tão pronunciado na viabilidade celular (esta foi reduzida para 86%). Mesmo assim, a Figura 26b mostra que após 72 horas de exposição, houve uma tendência para reduzir a produção de lactato por esse corante.

Observando a Figura 26 percebe-se que a produção de lactato pelos condrócitos não expostos aos corantes (controle negativo) foi de aproximadamente 0,6 mM após 24 horas e 1,9 mM após 48 horas, o que reflete um aumento de 3 vezes na produção de lactato num intervalo de 24 horas. Entretanto, após 72 horas de cultura a produção desse metabólito permaneceu constante (1,8 mM). Tal fato

pode ser explicado pela expansão dos condrócitos em monocamadas. Provavelmente até as primeiras 48 horas de cultura houve uma acentuada proliferação celular, que atingiu um platô após 72 horas, mantendo os níveis de lactato constantes.

Os condrócitos produzem ATP principalmente por glicólise, o que gera altos níveis de ácido lático (LEE, URBAN, 1997). Sendo assim, as concentrações de ácido lático é uma indicação rápida e direta da taxa de metabolismo celular (BOUBRIAK, URBAN, CUI, 2006). Partindo desse princípio e tendo em vista os resultados gerados nesse trabalho, pode-se dizer que o corante Disperse Red 13 interferiu na função e metabolismo dos condrócitos por reduzir a atividade mitocondrial e os níveis de lactato, respectivamente, enquanto o corante Disperse Orange 1 interferiu somente na função dessas células e o corante Disperse Red 1 não apresentou nenhum efeito nos *endpoints* analisados .

Ao comparar os resultados do ensaio de MTT em condrócitos e células HepG2 em monocamadas (Figuras 25 e 29), percebe-se que os corantes analisados interferiram de maneira mais intensa nas células HepG2. Tal fato pode ser explicado pelo número de mitocôndrias nos condrócitos articulares. Conforme dito anteriormente, os condrócitos obtêm energia principalmente por glicólise, uma via que não utiliza oxigênio, o que permite a essas células sobreviverem muitos dias sob anóxia. Sendo assim, os condrócitos consomem menos oxigênio do que outros tipos de células, o que justifica o reduzido número de mitocôndrias encontrado nesse tipo de célula *in vivo* (BOUBRIAK, BROOKS, URBAN, 2009). Embora o número de mitocôndrias aumente nos condrócitos cultivados em monocamadas (BOUBRIAK, BROOKS, URBAN, 2009), provavelmente esse número não atinja o mesmo conteúdo enzimático das mitocôndrias das células HepG2, visto que os hepatócitos são células ricas em mitocôndrias.

O corante Disperse Red 13 foi o mais tóxico para células hepáticas, semelhantemente aos condrócitos. Ao contrário dos outros corantes estudados, esse corante reduziu a atividade mitocondrial das células HepG2 cultivadas em monocamadas e em 3D a partir de 24 horas de exposição (Figuras 29e, 29f). Essa redução aumentou com o tempo de exposição, atingindo cerca de 30% dos valores do controle após 72 horas de exposição ao corante. Adicionalmente, esse corante, ao contrário dos outros testados, também reduziu a atividade de desidrogenases das

células HepG2 (Figuras 30e, 30f) tanto em monocamadas quanto em 3D; entretanto, a atividade mitocondrial foi mais afetada por esse corante do que a atividade de desidrogenases. Também foi avaliada a influência desse corante na atividade mitocondrial de células HepG2 cultivadas em 3D em perfusão. Entretanto, como foi exposto (Figura 29g) os dados gerados estão conflitantes. Possivelmente o plaqueamento de esferoides no bioreator utilizado e posterior perfusão não tenha sido um bom modelo para o ensaio, visto que os esferoides, ao contrário das cápsulas de alginato, podem se desprender e serem desprezados junto com o fluxo da perfusão. Outra causa a qual se pode atribuir o insucesso dessa técnica é a dificuldade de transferir os esferoides para uma placa no momento de colocar o sal de MTT. Não é aconselhável colocar o MTT no bioreactor porque esse corante pode ser absorvido pelo PDMS, material usado na fabricação do bioreator. Sendo assim, uma terceira causa para o problema encontrado pode ter sido a absorção dos próprios corantes pelo PDMS.

Assim como o Disperse Red 13 os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 também reduziram a atividade mitocondrial das células HepG2 para cerca de 70% quando cultivadas em monocamadas (Figuras 29a, 29c), mas não exerceram efeito significativo na atividade de desidrogenases dessas mesmas células (Figuras 30a,b; 30c,d).

Além disso, embora o corante Disperse Orange 1 tenha reduzido a atividade mitocondrial das células HepG2 cultivadas em monocamadas, não foi observado efeito significativo quando esse corante foi testado em células HepG2 cultivadas em 3D, ao contrário dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 . Tal fato pode ser atribuído ao ambiente em cultura tridimensional. Estudos têm demonstrado que células crescendo em esferoides são mais resistentes aos agentes citotóxicos do que aquelas em monocamadas (HOFFMAN, 1991, DHIMAN et al., 2005, SUN et al., 2006). Uma vez que os esferoides podem estabelecer uma geometria em 3D precisa e reproduzir a arquitetura do tecido *in vivo* (PAMPALONI et al., 2009), é possível que o corante Disperse Orange 1 não tenha atingido as células no centro dos esferoides e interagiram somente com as células HepG2 da superfície. Além disso, tendo em vista que os hepatócitos adquirem funções específicas do fígado quando agregados em esferoides, (PAMPALONI et al., 2009), possivelmente esse corante foi metabolizado por enzimas hepáticas produzidas pelos esferoides gerando produtos

que não afetaram a atividade mitocondrial das células HepG2. Assim, os resultados mostram que é importante testar toxicantes usando cultura de células em 3D, uma vez que esse tipo de cultura reproduz a arquitetura e bioquímica do tecido *in vivo* de maneira mais fidedigna, e assim fornece resultados mais precisos (HEWITT et al., 2007, PAMPALONI et al., 2009). Entretanto, deve ser ressaltado que apesar de vários ensaios toxicológicos baseados em modelos de cultura em 3D terem sido desenvolvidos e serem promissores devido a sua capacidade de mimetizar resposta específica de certos órgãos à ação de toxicantes, a validação desses ensaios é um longo processo (PAMPALONI et al., 2009).

5.2 Genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 após tratamento por cloração e fotoeletrocatálise

De uma maneira geral, pode-se observar que a cloração diminuiu a potência genotóxica de todos os corantes originais. Entretanto, esse tratamento manteve o efeito genotóxico apresentado pelo corante Disperse Red 13 em todas as concentrações testadas, embora com um índice de dano menor (Tabelas 3, 4 e 5). Esse fato pode ser explicado pela presença de um átomo de cloro na molécula do corante original, que será discutido posteriormente. Já os corantes fotoeletrocatalisados não apresentaram efeito genotóxico.

Considerando os resultados obtidos no ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, observa-se que assim como os corantes originais, os corantes clorados induziram maior atividade mutagênica com a linhagem YG1041 do que com a TA98. Tal fato pode ser explicado pela ação das enzimas nitroredutase e O-acetiltransferase que são produzidas em grande quantidade pela linhagem YG1041 e parecem desempenharem um importante papel na mutagenicidade desses corantes. O sistema de metabolização S9 reduziu a mutagenicidade apresentada tanto pelos corantes originais quanto pelos clorados. Possivelmente os produtos gerados após metabolização via citocromo P-450 têm menor potencial de causar danos ao DNA.

Analisando os resultados gerados por esse ensaio, observa-se que a cloração aumentou a mutagenicidade apresentada pelos corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 com a linhagem TA98 tanto na ausência quanto na presença de S9.

Com a linhagem YG1041, observa-se o oposto (Figuras 13 e 14). Essa diferença pode ser explicada tomando como base as enzimas que são produzidas em grande quantidade pela linhagem YG1041, conforme dito anteriormente. Aparentemente as enzimas O-acetiltransferase e nitroredutase agem nos corantes clorados gerando produtos que são menos mutagênicos do que aqueles derivados da ação dessas enzimas nos corantes originais.

O corante Disperse Red 13 apresentou um comportamento diferente. A cloração reduziu a mutagenicidade apresentada por esse corante com ambas as linhagens, TA98 e YG1041 (Figura 15). O corante original não apresentou mutagenicidade quando testado com a linhagem TA98 na presença de S9. Entretanto, após a cloração (Figura 15b) esse corante passa a apresentar atividade mutagênica para a linhagem TA98 na presença de S9, com potência mutagênica de 0,10 rev/µg. Provavelmente a cloração desse corante gerou produtos que requerem metabolização via citocromo P-450 para exercerem mutagenicidade. Tal fato pode ser explicado pela presença de um átomo de cloro na estrutura desse corante. Segundo Chung e Cerniglia (1992) a inserção de dois átomos de cloro na posição *para* um ao outro em dois anéis aromáticos ligados entre si tende a aumentar a mutagenicidade do composto. Possivelmente a cloração do corante Disperse Red 13 tenha inserido um cloro nessa posição em relação ao outro átomo de cloro já presente na estrutura (Figura 9). Para a linhagem YG1041 a cloração reduziu a potência mutagênica tanto na ausência quanto na presença de S9. As enzimas produzidas em grande quantidade por essa linhagem podem ter agido no corante clorado gerando produtos que são menos mutagênicos do que aqueles gerados no metabolismo do corante original.

Para os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1, o ensaio do cometa não mostrou o mesmo padrão de resposta apresentado pelo ensaio com Salmonella utilizando a linhagem TA98 (aumento do dano genético após cloração). Tal comportamento pode ser explicado tomando como base o tipo de dano causado por esses corantes. Conforme dito anteriormente, esses compostos atuam no DNA, causando deslocamento do quadro de leitura. Esse tipo de mutação pode ocorrer por adição ou deleção de bases nitrogenadas. Possivelmente a deleção de pequeno número de bases não pôde ser detectada pelo ensaio do cometa. Além disso, pode-se inferir que após cloração esses corantes não causam quebras cromossômicas.

Assim, a cloração dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 gerou compostos que causaram principalmente quebras no DNA e/ou mutações de ponto.

Baseando nos resultados com a linhagem YG1041, para a qual se obteve as maiores respostas, o corante Disperse Orange 1 foi o que mais teve a sua mutagenicidade reduzida após a cloração (3 vezes na ausência de S9 e 5 vezes na presença deste), seguido pelo Disperse Red 13 (3 vezes na ausência de S9 e 2,5 vezes na presença deste) e por último o Disperse Red 1 (2 vezes tanto na ausência quanto na presença de S9). Já a fotoeletrocatálise removeu completamente a mutagenicidade apresentada por todos os corantes estudados nesse trabalho.

Conforme dito anteriormente, somente o corante Disperse Orange 1 induziu apoptose nas células HepG2. Após o tratamento tanto por cloração quanto por fotoeletrocatálise, este corante perdeu esse efeito tóxico. Adicionalmente, os tratamentos não interferiram no comportamento dos outros corantes estudados, mantendo-os não tóxicos nas condições testadas.

Conforme mostrado previamente, somente os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 foram tóxicos para *Daphnia similis*. Os tratamentos por cloracão e fotoeletrocatálise dimunuíram a ecotoxicidade apresentada pelo corante Disperse Red 1, sendo que a cloração se mostrou mais eficiente. O mesmo aconteceu com o corante Disperse Red 13, entretanto, para esse corante a fotoeletrocatálise foi mais eficaz. Os produtos gerados pelo corante Disperse Orange 1 após os tratamentos, assim como esse corante no seu estado original, não foram tóxicos para *Daphnia similis*.

Ainda considerando a ecotoxicidade, somente o corante Disperse Red 1 foi tóxico para *Vibrio fischeri* no seu estado original. Após os tratamentos a fotoeletrocatálise foi mais eficiente do que a cloração na remoção da toxicidade apresentada. Curiosamente, os corantes Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 passaram a ser tóxicos para Vibrio após tratamento por cloração. Tal fato pode estar relacionado a alguma mudança na estrutura química desses corantes, pois conforme dito por Chung e Cerniglia (1992) e Hashimoto et al. (1977) e citado anteriormente, pequenas variações nas estruturas químicas dos corantes podem mudar suas propriedades tóxicas. Além disso, o corante Disperse Red 13 também passou a ser tóxico após tratamento por fotoeletrocatálise, o que foi muito curioso, uma vez que

esse método de tratamento se mostrou muito eficiente na remoção da mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade apresentada por esses corantes nos ensaios utilizando Salmonella, cometa e anexina V respectivamente. Assim, uma atenção maior deve ser dada na avaliação e utilização desse método de tratamento.

De acordo com o *Globally Harmonization System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS), sistema que visa padronizar e harmonizar a classificação de produtos químicos, o corante Disperse Red 13 é o que no seu estado original apresenta maior toxicidade aguda para a vida aquática, se enquadrando na categoria 1 do GHS, considerado muito tóxico (L(E)C50 ≤ 1 mg/L, onde L(E)C50 corresponde à LC50 para peixes após 96 horas de exposição ou EC50 ou LC50 após 48 horas de exposição em crustáceos ou EC50 após 72 ou 96 horas de exposição em algas ou outras plantas aquáticas). Após os tratamentos, tanto a cloração quanto a fotoeletrocatálise, esse corante passa a pertencer à categoria 2 do GHS (L(E)C50 > 1 mg/L ≤ 10 mg/L), sendo condiserado tóxico para a vida aquática. Já o corante Disperse Red 1 tanto no estado original quanto tratado pertence à categoria 2 do GHS, sendo considerado tóxico para a vida aquática. Tal fato mostra que os tratamentos não foram eficientes na destoxificação dos corantes, o que enfatiza novamente a necessidade de aprimoramento das técnicas de tratamento dos efluentes industriais. O corante Disperse Orange 1 não pôde ser classificado pelo GHS porque não se mostrou tóxico para *Daphnia similis*, um dos organismos (crustáceos) usados nesta classificação (GLOBALLY HARMONIZATION SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS [GHS], 2005).

Ao comparar os dados gerados pelos ensaios com *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*, percebe-se que os resultados foram diferentes. Por exemplo, o corante Disperse Orange 1 não foi tóxico para *Daphnia similis* em nenhuma condição testada, entretanto esse corante mostrou toxicidade para *Vibrio fischeri* após o tratamento por cloração. O corante Disperse Red 1 foi tóxico para os dois organismos em todas as condições testadas, entretanto os produtos gerados após a fotoeletrocatálise foram mais tóxicos para *Daphnia similis* do que os produtos clorados, comportamento oposto ao observado para o *Vibrio fischeri.* Por último, pode-se notar que o corante Disperse Red 13 só apresentou toxicidade para o *Vibrio fischeri* após os tratamentos enquanto para *Daphnia similis* esse composto foi tóxico

em todas as codições testadas. Tal fato pode ser explicado pela diferença na estrutura dos dois organismos. Sendo *Vibrio fischeri* uma bactéria, ele é um organismo unicelular, procarionte, com estrutura e mecanismo celulares bem mais simples do que a *Daphnia similis,* um microcrustáceo pluricelular, eucarionte, de organização e funcionamento celulares mais complexos. Além disso, os *endpoints* analisados são diferentes, para *Daphnia similis* a avaliação da toxicidade se baseia na inibição da capacidade natatória, já para *Vibrio fischeri* a toxicidade se manifesta através da inibição da luminescência da bactéria, conforme dito anteriormente.

5.3 Cloração x fotoeletrocatálise

Vários trabalhos têm mostrado a ineficiência da cloração no tratamento de efluentes e água.

Pizzolato et al. (2002) estudaram a eficiência do tratamento de um efluente têxtil por oxidação com hipoclorito de sódio (NaClO). Eles fizeram a caracterização química do efluente e avaliaram os seus produtos de degradação. Os autores observaram que a remoção da cor foi obtida em poucos minutos usando 1,3 mL/L de NaClO e pH 7,0. Entretanto, os corantes orgânicos não foram completamente oxidados pelo NaClO e muitos compostos degradados foram encontrados no efluente tratado, incluindo organoclorados.

A fim de investigar a mutagenicidade encontrada no Ribeirão de Cristais, região metropolitana de São Paulo, Oliveira et al. (2006) avaliaram soluções puras e cloradas do corante preto denominado pelos autores de *black dye commercial product* (BDCP), encontrado nesse corpo d'água. Esse corante é constituído pelos corantes C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Orange 37 e C.I. Disperse Violet 93. Os autores observaram que todas as soluções, tanto dos corantes originais quanto dos clorados, mostraram atividade mutagênica para o teste *Salmonella*/microssoma. Os resultados do ensaio de mutagenicidade desses compostos sugerem que eles sejam pelo menos em parte, responsáveis pela mutagenicidade encontrada nas amostras de água para consumo vindas do Ribeirão de Cristais, o que mostra a ineficiência da cloração na remoção da mutagenicidade desses corantes (OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Barros et al. (2006), a cloração de efluentes contendo corantes é um processo simples e barato mas gera produtos que mesmo em baixas concentrações

apresentam um grande risco à população devido às propriedades genotóxicas apresentadas por grande parte desses compostos.

Além disso, a cloração não é um tratamento adequado para degradar corantes do grupo dos dispersivos (ROBINSON et al., 2001). Szpyrkowicz, Juzzolino e Kaul (2001) fizeram um estudo comparativo da oxidação de corantes dispersivos por processos eletroquímicos, ozônio, hipoclorito e reagente de Fenton. Com base nos resultados, a cloração foi o pior tratamento empregado em termos de remoção de cor e demanda química de oxigênio (COD). Para doses pequenas de hipoclorito de sódio (até 1g/dm^3) o tempo de contato devia ser pelo menos 30 minutos e mesmo assim a eficiência era baixa (15 – 20%). Para doses maiores a eficiência da remoção não dependia do tempo de contato (aumentando o tempo de contato para 150 minutos a remoção do corante aumentava somente de 4 a 5%). Melhorando as condições, o máximo que os autores conseguiram foi uma remoção de 30% apenas. Assim, eles concluem que mesmo aumentando a dose de hipoclorito e o tempo de contato, o tratamento por cloração não atinge altos níveis de remoção da cor dos corantes dispersivos (SZPYRKOWICZ, JUZZOLINO, KAUL, 2001).

Sarasa et al. (1998) estudaram o efluente de uma indústria que produz azo corantes e emprega a cloração como método de tratamento. Por meio de análises por CG/MS e CG/FID os autores identificaram alguns compostos organoclorados resultantes desse tratamento, entre eles: cloroanilinas, cloronitrobenzenos e clorofenóis, substâncias que oferecem risco à saúde humana (SARASA et al., 1998). Além disso, segundo Hao, Kim e Chiang (2000) pode ser que esses compostos não sejam degradados por declorinação ou outras técnicas de tratamento.

Alaton, Tureli e Hanci (2009) citam o uso da cloração no tratamento de efluentes contendo corantes, mas ressaltam a desvantagem desse método em gerar compostos orgânicos halogenados.

Conforme dito anteriormente, o tratamento por cloração também é utilizado nas Estações de Tratamento de Água (ETAs) e assim como para os efluentes, esse método também não tem se mostrado eficaz na purificação da água bruta contendo corantes, como mostrado por Oliveira et al., (2006) no mesmo trabalho citado anteriormente relativo ao Ribeirão dos Cristais.

Além disso, é reconhecida a formação de produtos genotóxicos após a cloração de águas brutas, ainda que estas não possuam corantes como

contaminantes. Sabe-se que a cloração de água rica em material orgânico produz uma complexa mistura de compostos organoclorados, os *desinfection by products.* Alguns desses compostos têm apresentado propriedades mutagênicas e cancerígenas (KOIVUSALO, et al. 1997). A fim de avaliar a relação entre o consumo de água tratada e carcinogenicidade, foi realizado um extenso estudo com 621.431 pessoas morando em 56 cidades da Finlândia. Através de vários cálculos os autores concluíram que mulheres que consumiram água mutagênica por mais de 27 anos apresentavam um alto risco de câncer no reto e bexiga (KOIVUSALO, et al. 1997).

Marabini et al. (2007) avaliaram o potencial genotóxico e citotóxico da água para consumo de duas cidades italianas. Eles encontraram compostos orgânicos e nitrato nas amostras das duas cidades, sendo que em uma delas, embora não se observaram efeitos citotóxicos, foram observados efeitos genotóxicos em linfócitos. Na outra cidade analisada, a água para consumo induziu efeitos citotóxicos e genotóxicos em linfócitos e células HepG2.

Banerjee et al., (2008) investigaram genotoxicidade em amostras de água para consumo coletadas de torneiras na Índia. Através do ensaio do cometa eles observaram uma grande indução de dano ao DNA (p<0,001). Os autores concluem que a mistura cloro, alumínio e coagulantes poliméricos (CatflocT) usados no tratamento da água para consumo, tem um potente efeito genotóxico cumulativo em células eucariotas, o que oferece riscos potenciais para a saúde humana depois de exposição prolongada.

Bolognesi et al. (2004) estudaram a influência de desinfetantes clorados na formação de mutágenos na água para consumo humano. Os resultados dos testes de micronúcleo e cometa mostram que a exposição à água desinfetada induz claramente a interação entre o DNA e os produtos clorados.

Park et al., (2000) estudaram a genotoxicidade da água para consumo de três cidades coreanas. Utilizando o ensaio de *Salmonella*/microssoma eles encontraram que as amostras de água tratada das três cidades foram mutagênicas para as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na ausência e presença de S9, o que foi confirmado no teste de micronúcleos em medula óssea de rato. Como não foram encontrados efeitos genotóxicos na água bruta antes da cloração, os autores apontam o processo como um possível responsável pela genotoxicidade presente na água tratada.

Zani et al., (2005) investigaram a influência de diferentes etapas do tratamento na mutagenicidade encontrada na água tratada. Para isso, quatro amostras foram coletadas: água sem qualquer tipo de tratamento, após a desinfecção com dióxido de cloro, após filtração com carbono ativo e água de torneira. As amostras foram submetidas ao teste Microtox para avaliar a toxicidade e a diferentes testes de genotoxicidade: usando linhagens de *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, o SOS cromoteste com *Escherichia coli* e o teste Mutatox com *Vibrio fischeri*. O teste Microtox revelou alta toxicidade nas amostras de água tratada após a etapa de cloração. O que foi confirmado pelo teste Mutatox. Além disso, o teste com *Salmonella* mostrou toxicidade nas doses mais altas, o que inviabilizou a avaliação da mutagenicidade. O SOS cromoteste foi positivo para todas as amostras de água tratada, sem ativação metabólica. No teste com *S. cerevisiae* tanto a toxicidade quanto a genotoxicidade aumentaram durante as etapas de tratamento, especialmente em células sem indução do citocromo P450.

Wang et al. (2007) avaliaram a toxicidade da água bruta durante o processo de desinfecção com cloro. Eles observaram que a toxicidade das amostras de água foi correlacionada positivamente com a dosagem de cloro e concentração de carbônico orgânico dissolvido e negativamente com a concentração de amônia nitrogênio (NH_3 – H).

Umbuzeiro, Warren e Claxton (2006) investigaram amostras de água de duas Estações de Tratamento de Água em São Paulo. As duas amostras deram respostas similares para a combinação de linhagens TA7000 (TA7001, TA7002, TA7003, TA7004, TA7005 e TA7006) de *Salmonella typhimurium*, e causaram principalmente transversões CG – AT no DNA. Os autores sugerem que os *desinfection by products* halogenados gerados durante a cloração da água sejam os responsáveis pelos efeitos observados nas linhagens TA7000.

Como pode ser visto na literatura, vários são os relatos que mostram a ineficiência do tratamento de efluentes e água pelo método de cloração.

Assim, técnicas alternativas de tratamento de sistemas aquosos como a fotoeletrocatálise têm sido melhoradas visando a mineralização de compostos orgânicos tóxicos. Osugi et al., (2009) otimizando as condições da técnica para os três corantes estudados neste trabalho obtiveram remoção completa da mutagenicidade após 1 hora de tratamento por fotoeletrocatálise.

Zanoni, Sene e Anderson (2003) usaram a fotoeletrocatálise para degradar o corante reativo Remazol Brilliant Orange 3R. Eles observaram que com 3 horas de tratamento o corante já estava praticamente mineralizado (70% de redução do carbono orgânico total - TOC).

Osugi et al. (2006) investigaram a capacidade da oxidação fotoeletrocatalítica degradar o corante Remazol Turquoise Blue 15. Após 3 horas de tratamento, os autores observaram uma remoção de 100% da absorbância e redução de 79, 6% do TOC.

Carneiro et al. (2004) avaliaram a remoção da cor e degradação do corante reativo Orange 16. Os autores observaram que a remoção da cor ocorreu após 20 minutos de tratamento. Além disso, após 180 minutos de fotoeletrocatálise já se observava uma redução de 62% de TOC.

Carneiro et al. (2005) avaliaram a degradação do corante reativo Reactive Blue 4. A oxidação fotoeletroquímica desse corante no eletrodo de Ti/SnO_2/SbOx (3% mol)/RuO_2 (1% mol) conduziu a 100% de descolorização e 60% de remoção do TOC.

Fraga et al. (2009) avaliaram a produção de cloro na oxidação fotoeletrocatalítica de compostos clorados. Os autores perceberam que em condições otimizadas o método pode produzir cloro ativo em concentrações compatíveis com processos de desinfecção de água que usam esse reagente. Além disso, eles afirmam que o método foi aplicado com sucesso para tratar águas superficiais coletadas de um rio brasileiro, sendo que após 150 minutos de tratamento eles obtiveram redução de 90% de TOC, 100% de remoção da turbidez, 93% da diminuição da cor e remoção de 96% da demanda química de oxigênio (COD). Esse método também foi utilizado no tratamento de 250 mL de uma solução contendo 0,05 mol/L de NaCl e 50 µg/L de *Microcystin aeruginosa.* A bactéria foi completamente removida após 5 minutos de fotoeletrocatálise, o que sugere que este método pode ser considerado uma alternativa promissora aos desinfetantes baseados em cloro.

Li et al. (2007) analisaram a eficiência de três processos de degradação (fotocatálise, oxidação eletroquímica e fotoeletrocatálise) no tratamento de amostras de água originadas de um campo petrolífero. Os autores observaram que a fotoeletrocatálise exibiu a maior capacidade de reduzir genotoxicidade da amostra,

enquanto a fotocatálise foi o método menos efetivo no tratamento. Por fim eles concluem que a fotoeletrocatálise foi a tecnologia mais eficiente para degradar efluentes de campos petrolíferos.

Macedo et al. (2007) estudaram a eficiência da fotoeletrocatálise na degradação de um corante utilizado para tingir couro. Os resultados deste estudo indicaram que o corante pode ser totalmente degradado e mineralizado em produtos inorgânicos como íons NH_4^+. Além disso, os autores observaram que durante um período de 480 minutos de tratamento, a taxa de descolorização foi maior que 90%.

Considerando o exposto, a fotoeletrocatálise é uma alternativa promissora no tratamento de efluentes e água em substituição à cloração convencional, entretanto devem-se considerar alguns aprimoramentos na técnica, uma vez que esse tratamento, embora tenha removido a genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade dos corantes aqui estudados, não foi eficaz na remoção da ecotoxicidade dos mesmos.

Os dados sobre mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes originais comparados com os clorados foram publicados no periódico Mutation Research, enquanto os dados de genotoxicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade do corante Disperse Orange 1 foram agrupados e publicados no periódico Journal of Hazardous Materials. Além disso, fomos convidados para escrever um capítulo sobre aminas aromáticas para a revista Frontiers in Bioscience, o qual já foi aceito e o livro encontra-se em fase de finalização, com publicação prevista para 2012. Os dados gerados durante o doutorado sanduíche foram enviados para publicação no periódico Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os corantes originais Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 são genotóxicos para as células HepG2 pelo ensaio do cometa;
- A genotoxicidade dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 é reduzida após o tratamento por cloração. No caso do corante Disperse Red 13 a genotoxicidade, embora menos intensa, se mantém para todas as concentrações testadas;
- Para todos os corantes, a genotoxicidade é totalmente removida após o tratamento por fotoeletrocatálise;
- Tanto os corantes originais quanto os tratados induzem maior atividade mutagênica com a linhagem YG1041;
- A cloração dos corantes estudados reduz a mutagenicidade apresentada pelos mesmos para a linhagem YG1041;
- Para a linhagem TA98, na qual se observa as menores respostas, a cloração aumenta a mutagenicidade apresentada pelos corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 tanto na ausência quanto na presença de S9 e reduz a atividade mutagênica do Disperse Red 13;
- Após a cloração o Disperse Red 13 passa a apresentar atividade mutagênica para a linhagem TA98 na presença de S9;
- O sistema de metabolização S9 reduz a mutagenicidade apresentada tanto pelos corantes originais quanto pelos clorados;
- A fotoeletrocatálise remove a mutagenicidade apresentada pelos corantes originais para o ensaio *Salmonella*/microssoma;
- Somente o corante Disperse Orange 1 induz apoptose pelo ensaio com anexina V e iodeto de propídeo. Essa citotoxicidade é removida por ambos os tratamentos, cloração e fotoeletrocatálise;
- Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 são tóxicos para *Daphnia similis* nas condições testadas. Os tratamentos por cloração e fotoeletrocatálise diminuem a toxicidade apresentada, sendo que a cloração é

mais eficiente na destoxificação do Disperse Red 1 e a fotoeletrocatálise mais eficiente na remoção da toxicidade do Disperse Red 13;

- Somente o corante Disperse Red 1 é tóxico para *Vibrio fischeri* nas condições testadas. Os dois tratamentos diminuem essa toxicidade e a fotoeletrocatálise se mostra mais eficiente;
- Os corantes Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 passam a ser tóxicos para *Vibrio fischeri* após cloração;
- O corante Disperse Red 13 passa a apresentar toxicidade para *Vibrio fischeri* também após a fotoeletrocatálise;
- Os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 diminuem a atividade mitocondrial dos condrócitos cultivados em monocamadas;
- Dos corantes estudados, somente o Disperse Red 13 diminui a produção de lactato pelos condrócitos nas condições testadas;
- Todos os corantes estudados reduzem a atividade mitocondrial das células HepG2 cultivadas em monocamadas;
- Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 diminuem a atividade mitocondrial das células HepG2 cultivadas em 3D;
- Pode-se obter respostas diferentes em células cultivadas em monocamadas e em 3D, como foi o caso do corante Disperse Orange 1 na atividade mitocondrial das células HepG;
- Dos corantes estudados somente o Disperse Red 13 diminui a atividade de desidrogenases das células HepG2 e tal efeito é observado tanto no cultivo em monocamadas quanto em 3D;
- Baseado nos experimentos realizados nesse trabalho, o corante Disperse Red 13 é o mais tóxico para condrócitos e células HepG2;
- Embora seja um método promissor, atenção deve ser dada na avaliação e aplicação da fotoeletrocatálise como um método alternativo à cloração.

Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATON, I.A.; TURELI, G.; HANCI, T.O. Treatment of azo dye production wastewaters using Photo-Fenton-like advanced oxidation processes: Optimization by response surface methodology. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.202, p.142–153, 2009.

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

AN, Y.; 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.

ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v.53, p. 51-59, 1999.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. **Métodos de ensaio e toxicidade com organismos aquáticos.** Em: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006, p.117-152.

ARLT, V.M., GLATT, H.,MUCKEL, E., PAPEL, U., SORG, B.L., SCHMEISER, H., PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. **Carcinogenesis** v. 23, p.1937–1945, 2002

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS [ABNT] (1993). Água. Ensaio de toxicidade com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea. NBR 12713, Rio de Janeiro, Brasil.

AZUR ENVIRONMENTAL,1998.Microtox manual.Disponível em < www.azurenv. com> acesso em 12 de junho de 2010.

BAE, J.S.; FREEMAN, H.S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the Daphnia magna. **Dyes and Pigments**, v.73, p.81-85, 2007.

BANERJEE, P.; TALAPATRA, S.N.; MANDAL, N.; SUNDARAM, G.; MUKHOPADHYAY, A.; CHATTOPADHYAY, D.; BANERJEE, S. Genotoxicity study with special reference to DNA damage by comet assay in fission yeast, Schizosaccharomyces pombe exposed to drinking water. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.402–407, 2008.

BARROS, A.L.; PIZZOLATO, T.M.; CARISSIMI, E.; SCHNEIDER, I.A.H. Decolorizing dye wastewater from the agate industry with Fenton oxidation process. **Minerals Engineering**. v. 19, p.87–90, 2006.

BARTSCH, H. Metabolic activation of aromatic amines and azo dyes. **IARC** v.40, p.13–30, 1981.

BAYO, J.; ANGOSTO, J.M.; LOPEZ, M.D.G. Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by *Vibrio fischeri* bioassay after a chlorination–dechlorination process. **Journal of Hazardous Materials**, *in press*, 2009.

BEATRICI, A.C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de Daphnia similis (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas.** UFRS, 2001. 18 páginas. Dissertação (bacharelado) Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BENNETT, J.; CUBBAGE, J. Review and Evaluation of Microtox® Test for Freshwater Sediments. Washington State Department of Ecology Environmental, Investigations and Laboratory Services Program. Toxics, Compliance, and Ground Water Investigations Section. Olympia, Washignton., 1992.

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

BILODEAU, K.; MANTOVANI, D. Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. **Tissue Engineering**, v.12, p.2367-2383, 2006.

BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHI, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDE, M.; POLI, P.; ROSSI, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of the Total Environment**, v.333, p.127– 136, 2004.

BOUBRIAK, O.A.; URBAN, J.P.G; CUI, Z.F. Monitoring of lactate and glucose levels in engineered cartilage construct by microdialysis. **Journal of Membrane Science**, v.273, p.77–83, 2006.

BOUBRIAK, O.A.; J.T.S., BROOKS, J.P.G., URBAN. Cytochrome c oxidase levels in chondrocytes during monolayer expansion and after return to three dimensional culture. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.7, p.1084 -1092, 2009.

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

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

BROWN,T.A. The Molecular Basis of Genome Evolution in: _ **Genomes**. Oxford: Wiley-Liss, 1999. cap 13, p.330-365.

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

BURG, K.J.L.; HOLDER, W.D.; CULBERSON, C.R.; BEILER, R.J.; GREENE, K.G.; LOEBSACK, A.B.; ROLAND, W.D.; EISELT, P.; MOONEY, D.J.; HALBERSTADT, C.R. Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. **Biomedical Materials Research**, v.51, p.642-649, 2000.

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

CARNEIRO, P.A, OSUGI, M.E., FUGIVARA, C.S., BORALLE, N., FURLAN, M., ZANONI, M.V.B. Evaluation of different electrochemical methods on the oxidation and degradation of Reactive Blue 4 in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 59, p.431–439, 2005.

CERNÁ, M.; HÁJEK, V.; STEJSKALOVÁ, E.; DOBLÁS, L.; ZUDOVÁ, Z.;ROSSNER, P. Environmental genotoxicity monitoring using *Salmonella* typhimurium strains as indicator system. **The Science of the Total Environment** , v.101, p. 139—147, 1991.

CHATURVEDI, V.; SREEDHAR, A.S. Hsp90 inhibition induces destabiliztion of actin cytoskeleton in tumor cells: functional significance de Hsp90 interaction with F-actin. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.715-722, 2010.

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

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

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

CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; MONTEITH, L.G.; MYERS, L.E.; HUGHES, T.J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the Salmonella typhimurium mutagenicity assay: I. Without exogenous activation. **Mutation Research**, v.253, p.137–147, 1991.

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

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principle, Applications and Limitations. *Molecular Biotechnology*, v.26, p.249-261, 2004.

COLLINS, A.R; AI-GUO; M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336 p.69-77, 1995.

COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO [SABESP]. Disponível em <http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=2&temp2=3&proj=sabesp&pub=T&nome=Uso_Racional_Agua_Generico&db=&docid=0559F0B0B4127513832570D1006527A2> acesso em 10/05/2009.

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

CUI, Z.F.; XU, X.; TRAINOR, N.; TRIFFITT, J.T.; URBAN, J.P.G.; TIRLAPUR, U.K. Application of multiple parallel perfused microbioreactors and three-dimensional stem cell culture for toxicity testing. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1318-1324, 2007.

DHIMAN, H.K., RAY, A.R., PANDA, A.K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, v.26, p.979–986, 2005.

DOJINDO. Cell Couting Kit-8, 2010. Technical Manual. Disponível em <www.dojindo.com> Acesso em 03 de janeiro de 2010.

DURAND, R. E.; BROWN, S. M. Effects of lucanthone on chinese hamster V-79 cells I. Interaction with radiation in monolayers and spheroids. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v.6, p.1525-1530, 1980.

ELKAYAM, T.; AMITAY-SHAPRUT, S.; DVIR-GINZBERG, M; HAREL, T.; COHEN, S. Enhancing the drug metabolism activities of C3A - a human hepatocyte cell line – by tissue engineering within alginate scaffolds. **Tissue Engineering**, v.12, p.1357-1368, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Patology**, v.35, p.495 – 516, 2007.

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

EKWALL, B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. **Annals of the New York Of Science**, v.407, p.64-77, 1983.

ECOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ASSOCIATION OF DYES AND ORGANIC PIGMENTS MANUFACTURERS [ETAD]. Information on the 19th Amendment of the Restrictions on the Marketing and Use of certain azocolourants (Directive 2002/61/EC of the EP and of the EC of 19 July 2002). Disponível em:<http:// www.etad.com/information/information.php.>. Acesso em 28 dez. 2008.

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**, in press, 2010.

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

FRAGA, L.E.; ANDERSON, M.A.; BEATRIZ, M.L.P.M.A.; PASCHOAL, F.M.M.; ROMÃO, L.P.; ZANONI, M.V.B. Evaluation of the photoelectrocatalytic method for oxidizing chloride and simultaneous removal of microcystin toxins in surface waters. **Electrochimica Acta**, v.54, p.2069–2076, 2009.

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

FUKUNAGA, M. T., **Estudo da Degradação de Efluentes Aquosos Derivados da Indústria Produtora de Fenol Através de Eletrólise Foto-Assistida**, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 104 p. Tese (Doutorado).

GAHYVA, S.M.M.; JUNIOR, J.F.S. Direct genotoxicity and mutagenicity of endodontic substances and materials as evaluated by two prokaryotic test systems**.** **Journal of Applied Oral Science**, v.13, p.387-392, 2005.

GARLE, M.J.; FENTEM, J.H.; FRY, J.R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicology in Vitro**, v.8, p.1303-1312, 1994.

GHIRARDINI, A.V.; GIRARDINI, M.; MARCHETTO, D.; PANTANI, C. Microtox® solid phase test: Effect of diluent used in toxicity test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p.851–861, 2009.

GLICKLIS, R.; SHAPIRO, L.; AGBARIA, L.; MERCHUK, J.C.; COHEN, S. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, p.344-353, 2000.

GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS (GHS), 2005. Part 3. Health and Environmental Hazards. United Nations.

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

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

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

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

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

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

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

HAMELINK, J. L.; SPACIE, A. Fish and chemicals: the process of accumulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicoly**, v.17, p.167-177, 1977.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman – Karber for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, Environmental Science Technology, v.11, p.714 – 719, 1977.

HARMEL, V.C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais** Universidade Regional de Blumenau**,** 2004. 100 páginas. Tese (mestrado). Programa de pós graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2004.

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

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

HÄUSELMANN, H.J.; FERNANDES, R.J.; MOK, S.S.; SCHMID, T.M.; BLOCK, J.A.; AYDELOTTE, M.B.; KUETTNER, K.E.; THONAR, E.J.M.A. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. **Journal of Cell Science**, v.107, p.17-27, 1994.

HEWITT, N.J., LECHON, M.J., HOUSTON, J.B., HALLIFAX, D., BROWN, H.S., MAUREL, P., KENNA, J.G., GUSTAVSSON, L., LOHMANN, C., SKONBERG, C., GUILLOUZO, A., TUSCHL, G., LI, A.P., LECLUYSE, E., GROOTHUIS, G.M.M., HENGSTLER, J.G. Primary hepatocytes: Current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. **Drug Metabolism Review**, v.39, p.159–234, 2007.

HOFFMAN, R.M. Three-dimensional sponge-gel matrix histoculture: methods and applications. **Cell Biology: A Laboratory Handbook**, p.367-379, 1994.

HOFFMAN, R.M. Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research. **Cancer Cells**, v.3, p.86–92, 1991.

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

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

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Apoptosis – Signals and Diseases. **Biochemica**, n.3, p.24 – 27, 1999.

INCH, W.R.; MCCREDIE, J.A.; SUTHERLAND, R.M. Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. **Growth**, v. 34, p. 271-282, 1970.

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

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

JENNINGS, V.L.K.; BRANDES, M.H.R.; BIRD, D. Assessing chemical with the bioluminescent photobacterium (Vibrio fischeri): a comparison of three commercial systems. **Chemosphere**,v.102, p.109, 2001.

KAPLAN, C.; DIRIL, N.; SAHIN, S.;CEHRELI, M.C. Mutagenic potentials of dental cements as detected by the *Salmonella*/microsome test. **Biomaterials**, **Guildford**, v.25, p.4019-4027, 2004.

KELM, J.M.; TIMMINS, N.E.; BROWN, C.J.; FUSSENEGGER, M.; NIELSEN, L.K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types**. Biotechnology and Bioengineering**, v.83, p.173-180, 2003

KHALIL, M.; PANAHI, A.S.; TOOTLE, R.; RYDER, T.; MCCLOSKEY, P.; ROBERTS, E.; HODGSON, H.; SELDEN, C. Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function**. Journal of Hepatology**, v.297, p.68-77, 2001.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, 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. **Mutatation Research.**, v. 402, p. 185-202, 1998.

KOIVUSALO, M.K; PUKKALA, E.;VARTIAINEN, T.; JAAKKOLA, J.J.K.; HAKULINEM, T. Drinking water chlorination and cancer – a historical cohort study in Finland. **Cancer Causes and Control***,* v.8, p.192-200, 1997.

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

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

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

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia Biologica**, v.45, n.3-4, p.153-156, 1997.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v.44, p.205–221, 2008.

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

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

LAN, S.F.; MROCZKA, B.S.; STARLY, B. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: a study of cell viability. morphology and drug metabolism. **Toxicology in Vitro**, v.24, p.1314-1323, 2010.

LEDERBERG, J. A challange for toxicologists. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.1, p.110-112, 1981.

LEE, R.B.; URBAN, J.P. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. **Biochemical. J.**, v.321(Pt 1), p.95–102. 1997.

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

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

LIMA, R.O.A.; BAZO, A.P.; SALVADORI, D.M.F.; RECH, C.M.; OLIVEIRA; D.P.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research**, v.626, p.53-60, 2007.

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

LU, N.; CHEN, S.; WANG, H.; QUAN, X.; ZHAO, H. Synthesis of molecular imprinted polymer modified TiO2 nanotube array electrode and their photoelectrocatalytic activity. **Journal of Solid State Chemistry**, v.181, p.2852–2858, 2008.

MACEDO, L.C.; ZAIA, D.A.M.; MOORE, G.J.; SANTANA, H. Degradation of leather dye on TiO2: A study of applied experimental parameters on photoelectrocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.185, p.86–93, 2007.

MALINS, D.C. Perspectives in aquatic toxicology. **Annual Review of Pharmacoly and Toxicology**, v.31, p.371-399, 1991.

MARABINI, L; FRIGERIO, S.; CHIESARA, E.; MAFFEI, F.; FORTI, G.C.; HRELIA, P.; BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C.; RADICE, S. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of chlorinated drinking waters sampled along the distribution system of two municipal networks. **Mutation Research**, v.634, p.1–13, 2007.

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

MAZZO,T.M.; SACZK, A.A.; UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V.B.Analysis of aromatic amines in surface waters receiving wastewater from textile industry by liquid chromatographic with eletrochemical detection. **Analitical Letters,**v.39, p.2671-2685, 2006.

MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? **Genes & Nutrition,** v.4, p.13-22, 2009.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; SMYTH, W.F. Mini-review: microbial decolorisation and degradation of textile dyes. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.56, p.81–87, 2001.

MEIJER, A.J; CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.2445–2462, 2004.

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

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

MOSCONA, A. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 43, p. 184-194, 1957.

NOVOTNY, C.; DIAS, N., KAPANEN, A.; MALACHOVÁ, K.; VÁNDROVCOVÁ, M.; ITÃVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo-and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v.63, p.1436-1442, 2006.

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

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

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

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

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guideline for testing of Chemicals, n°202, Adopted:13/04/2004

ORIVE, G.; HERNANDEZ, R.M.; GASCON, A.R.; IGARTUA, M.; PEDRAZ, J.L. Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.18, p.23–30, 2003.

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

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

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

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

OTHMER, K. Encyclopedia of Chemical Technology. V.8, 4ed. Estados Unidos, 1993.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E.G.; STELZER, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.839-845, 2007.

PAMPALONI, F.; STELZER, E.H.K. Three-dimensional cell cultures in toxicology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews,** v.26, p.129-150, 2009.

PARK, J.H.; LEE, B.J; LEE, S.K; KIM, K.; LEE, K.H.; CHE, J.H.; KANG, K.S.; LEE, Y.S. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. **Mutation Research**, v.466-2000, p.173–178, 2000.

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

PHILLIPS, J.C.; GIBSON, W.B.; YAM, J.; Alden, C.L.; Harg, G. Survey of the QSAR and *in vitro* approaches for developing non-animal methods to supersede the *in vivo* LD50 test. **Food and Chemical Toxicology**, v.28, p.375-394, 1990.

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

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

PRITCHARD, J.B. Aquatic Toxicology: Past, Present, and Prospects. **Environmental Health Perspectives**, v.100, p.249-257, 1993.

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

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

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

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography** *B*, v.722, p.25-254, 1999.

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

SARASA, J.; ROCHE, M.P.; ORMAD, M.P.; GIMENO, E.; PUIG, A.; OVELLEIRO, J.L. Treatment of a wastewater resulting from dyes manufacturing with ozone and chemical coagulation. **Water Research**, v.32, p.2721-2727, 1998.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.;MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, v.393, n.1-2, p.133-139, 1997.

SCHAFER, H.; SCHAFER, A.; KIDERLEN, A.F.; MASIHI, K.N.; BURGER, R. A highly sensitive cytotoxicity assay based on the release of reporter enzymes, from stably transfected cell lines. **Journal of Immunological Methods**, v.204, p.89-98, 1997.

SEIDEL, J.O., PEI, M., GRAY, M.L., LANGER, R., FREED, L.E., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Long-term culture of tissue engineered cartilage in a perfused chamber with mechanical stimulation. **Biorheology**, v.41, p.445–458, 2004.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, v.22, p. 1117-1119, 1991.

SHINTAKU, S.F.; IMBROISI, D.; SANTOS, A.J.M.G. Processos oxidativos avançados e tratamento de corantes sintéticos. Anais da ABQ (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA). Brasília, 2004. Disponível em <http://www.unb.br/ resqui/abq2004-1.pdf> Acesso em 08 de out de 2006.

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

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

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

SMETANA, K. Cell biology of hydrogels. **Biomaterials**, v.14, p.1046-1050, 1993.

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

STAHLMANN, R., WEGNER, M., RIECKE, K., KRUSE, M., PLATZEK, T. Sensitising potential of four textile dyes and their metabolites in a modified local lymph node assay**. Toxicology**, v. p. 219, 113–123, 2006.

STEEG ,P.S.; ALLEY, M.C.; GREVER, M.R. An added dimension: will three-dimensional cultures improve our understanding of drug resistance? **Journal of the National Cancer Institute**, v.86, p.953-955, 1994.

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

STRICKER, J.; FALZONE, T.; GARDEL, M.L. Mechanics oftheF-actincytoskeleton. **Journal of Biomechanics**, v.43, p.9–14, 2010.

SUN, T.; JACKSONA, S.; HAYCOCK, J.W.; MACNEIL, S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, v.122, p.372–381, 2006.

SWEENEY, E.A., CHIPMAN, J.K., FORSYTHE, S.J. Evidence of direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. **Environmental Health Perspectives**. v.102, p.119–122, 1994.

SZPYRKOWICZ,L.; JUZZOLINO, C.; KAUL, S.N. A comparative study on oxidation of disperse dyes by electrochemical process, ozone, hypochlorite and fenton reagent. Wat. Res. VOL. 35, NO. 9, PP. 2129–2136, 2001.

TAUCHERT, E.; ZAMORA, P.P. Avaliação de processos fotoeletroquímicos no tratamento de líquidos lixiviados de aterros sanitários. **Engenharia Sanitária Ambiental,** v.9, p.197-201, 2004.

TENNANT, J.R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. **Transplantation**, v.2, issue 6, p. 685-815, 1964.

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

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F; MANTOVANI, M.S.; KNASMULLER, 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.

TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; MADARAME, H.; UENO, S.; SUSA, N.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, N.; SEKIHASHI , K.; SASAKI, Y.F. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mutation Research**, v.465, p.11–26, 2000.

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

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

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

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

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: **Mutagênese Ambiental**, Eds. Lucia Regina Ribeiro, Daisy Maria Fávero Salvadori & Edmundo Kanan Marques, Editora da ULBRA, capítulo 4, pp. 81-112.

UMBUZEIRO, G.A; WARREN, S.; CLAXTON, L.D. The mutation spectra of chlorinated drinking water samples using the base-specific TA7000 strains of *Salmonella* in the microsuspension assay. **Mutation Research**, v.609, p.26–33, 2006.

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

WANG, L.; YAN, J.; HARDY, W.; MOSLEY, C.; WANG, S.; YU, H. Light-induced mutagenicity in *Salmonella* TA102 and genotoxicity/cytotoxicity in human T-cells by 3,3'-dichlorobenzidine: a chemical used in the manufacture of dyes and pigments and in tattoo inks. **Toxicology**, v. 207, p.411-418, 2005.

WANG, L.S.; WEI, D.B.; WEI, J.; HU, H.Y. Screening and estimating of toxicity formation with photobacterium bioassay during chlorine disinfection of wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v.141, p.289–294, 2007.

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

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

ZANI, C.; FERETTI, D.; BUSCHINI, A.; POLI, P.; ROSSI, C; GUZZELA, L.; CATERINO, F.D.; MONARCAS. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. **Mutation Research,** v.587, p.26–37, 2005.

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

ZIOLLI, R.L.; JARDIM, W.F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO_2. **Química Nova**. v.21, p.319-325, 1998.

Foto da capa disponível em <http://www.flickr.com/photos/cokada/553634989/ in/photostream> acesso em 17 de outubro de 2011.

Apêndices

APÊNDICE A - Dados brutos gerados no ensaio Salmonella/microssoma

Corantes Clorados

TABELA 1. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem TA98, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	37	33	28	31,00	5,05
5	34	37	22	31,00	7,94
10	46	31	37	38,00	7,55
50	70	84	83	79,00	7,81**
100	105	78	118	100,33	20,40**
500	395	295	374	354,67	523,73**
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	560	530	545,00	21,21**
Com S9					
0	24	39	30	29,80	5,97
50	35	32	34	33,67	1,53
100	30	37	33	33,33	3,51
500	102	74	77	86,00	18,25*
1000	161	192	204	185,67	22,19**
Controle positivo	2AA (2,5 µg/placa)	1070	1130	1100	42,42**

[1] D.P. = desvio padrão
* significante a 5%
** significante a 1%

TABELA 2. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	61	51	59	51,40	8,56
	42	44			
0,05	49	55	44	49,33	5,51
0,10	51	53	53	52,33	1,15
0,50	61	87	72	73,33	13,05
1,00	93	89	84	88,67	4,51**
5,00	224	235	203	220,67	16,26**
Controle positivo	4NOP (10 µg/placa)	600	730	665,00	91,92**
Com S9					
0	52	56	58	57,8	4,15
	60	63			
0,05	58	52	50	53,33	4,16
0,10	61	59	59	59,67	1,15
0,50	61	66	63	63,33	2,52
5,00	70	77	93	80,00	11,79
10,00	119	100	126	115,00	13,45**
Controle positivo	2AA (0,0625 µg/placa)	210	220	215	7,07**

[1] D.P. = desvio padrão
** significante a 1%

TABELA 3. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem TA98, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	37	33	28	31,00	5,05
0,10	31	26	33	30,00	3,61
0,50	47	41	44	44,00	3,00*
1,00	69	56	68	64,33	7,23**
5,00	210	190	199	199,67	10,02**
10,00	367	336	346	349,67	15,82**
50,00	992	854	1156	1000,67	151,19**
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	560	530	545,00	21,21**
Com S9					
0	24	39	30	29,80	5,97
1	20	27	--	23,50	4,95
5	54	57	--	55,50	2,12**
10	80	83	--	81,50	2,12**
50	329	290	356	325,00	33,18**
100	711	738	843	764,00	69,74**
Controle positivo	2AA (2,5 µg/placa)	1070	1130	1100	42,42**

[1] D.P. = desvio padrão
* significante a 5%
** significante a 1%

TABELA 4. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	61	51	59	51,40	8,56
	42	44			
0,01	47	50	50	49,00	1,73
0,05	71	73	52	65,33	11,59
0,10	80	93	78	83,67	8,14*
0,50	152	232	223	202,33	43,82**
Controle positivo	4NOP (10 µg/placa)	600	730	665,00	91,92**
Com S9					
0	52	56	58	57,80	4,15
	60	63			
0,05	52	71	65	62,67	9,71
0,10	59	66	67	64,00	4,36
0,50	117	113	--	115,00	2,83**
1,00	167	156	143	155,33	12,01**
Controle positivo	2AA (0,0625 µg/placa)	210	220	215	7,07**

[1] D.P. = desvio padrão
* significante a 5%
** significante a 1%

TABELA 5. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem TA98, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	37	33	28	31,00	5,05
5	32	28	35	31,67	3,51
10	42	28	46	38,67	9,45
50	34	37	42	37,67	4,04
100	58	49	57	54,67	4,93**
200	62	71	92	75,00	15,39**
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	560	530	545,00	21,21**
Com S9					
0	24	39	30	29,80	5,97
0,50	44	23	33	33,33	10,50
5,00	55	33	39	42,33	11,37
50,00	39	43	41	41,00	2,00
100,00	59	44	77	60,00	16,52
400,00	52	82	87	73,67	18,93*
Controle positivo	2AA (2,5 µg/placa)	1070	1130	1100	42,42**

[1] D.P. = desvio padrão
* significante a 5%
** significante a 1%

TABELA 6. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem YG1041, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	61	51	59	51,40	8,56
	42	44			
0,50	72	63	58	64,33	7,09
1,00	64	73	85	74,00	10,54
5,00	130	117	123	123,33	6,51**
10,00	217	171	170	186,00	26,85**
Controle positivo	4NOP (10 µg/placa)	600	730	665,00	91,92**
Com S9					
0	52	56	58	57,8	4,15
	60	63			
0,10	48	49	55	50,67	3,79
0,50	50	52	58	53,33	4,16
5,00	65	67	63	65,00	2,00
50,00	70	72	70	70,67	1,15*
100,00	82	88	86	85,33	3,06**
Controle positivo	2AA (0,0625 µg/placa)	210	220	215	7,07**

[1] D.P. = desvio padrão
* significante a 5%,
** significante a 1%

Corantes Fotoeletrocatalisados

TABELA 1. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem TA98, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	16	16	17	16,80	1,30
5	19	20	22	20,33	1,53
10	31	21	20	24,00	6,08
50	22	22	--	22,00	0,00
100	22	28	21	23,67	3,79
500	27	21	20	22,67	3,79
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	400	380	390,00	14,14**
Com S9					
0	35	27	24	29,00	6,12
50	29	30	25	28,00	2,65
100	29	31	27	29,00	2,00
500	25	36	25	28,67	6,35
1000	35	31	28	31,33	3,51
Controle positivo	2AA (2,5 µg/placa)	910	1160	1035	176,78**

[1] D.P. = desvio padrão
** significante a 1%

TABELA 2. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	45	43	50	43,60	4,22
	41	39			
0,05	44	53	42	46,33	5,86
0,10	39	48	45	44,00	4,58
0,50	49	46	43	46,00	3,00
1,00	49	38	45	44,00	5,57
5,00	50	36	45	43,67	7,09
Controle positivo	4NOP (10 µg/placa)		950 970	960,00	14,14**
Com S9					
0	50	48	52	51,80	4,82
	49	60			
0,05	49	60	53	54,00	5,57
0,10	59	49	60	56,00	6,08
0,50	53	56	52	53,67	2,08
5,00	54	51	--	52,50	2,12
10,00	53	56	45	51,00	5,57
Controle positivo	2AA (0,0625 µg/placa)		390 310	350	56,57**

[1] D.P. = desvio padrão
** significante a 1%

TABELA 3. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem TA98, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	16	16	17	16,80	1,30
0,10	19	18	19	18,67	0,58
0,50	18	17	--	17,50	0,71
1,00	19	18	--	18,50	0,71
5,00	19	19	21	19,67	1,15
10,00	18	21	19	19,33	1,53
50,00	19	22	--	20,50	2,12
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	400	380	390,00	14,14**
Com S9					
0	35	27	24	29,00	6,12
1	33	26	28	29,00	3,61
5	30	27	24	27,00	3,00
10	39	26	22	29,00	8,89
50	35	26	28	29,67	4,73
100	24	34	24	27,33	5,77
Controle positivo	2AA (2,5 µg/placa)	910	1160	1035	176,78**

[1] D.P. = desvio padrão
** significante a 1%

TABELA 4. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	45	43	50	43,60	4,22
	41	39			
0,01	42	34	38	38,00	4,00
0,05	46	42	30	39,33	8,33
0,10	37	38	46	40,33	4,93
0,50	44	47	38	43,00	4,58
Controle positivo	4NOP (10 µg/placa)	950	970	960,00	14,14**
Com S9					
0	50	48	52	51,80	4,82
	49	60			
0,05	46	59	48	51,00	7,00
0,10	53	49	57	53,00	4,00
0,50	48	45	59	50,67	7,37
1,00	42	59	51	50,67	8,50
Controle positivo	2AA (0,0625 µg/placa)	390	310	350	56,57**

[1] D.P. = desvio padrão
** significante a 1%

TABELA 5. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem TA98, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	16	16	17	16,80	1,30
		19	16		
5	16	21	19	18,67	2,52
10	20	24	19	21,00	2,65
50	17	21	20	19,33	2,08
100	16	22	--	19,00	4,24
200	19	22	18	19,67	2,08
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	400	380	390,00	14,14**
Com S9					
0	35	27	24	29,00	6,12
		23	36		
0,50	30	42	37	36,33	6,03
5,00	24	31	21	25,33	5,13
50,00	29	29	29	29,00	0,00
100,00	23	29	28	26,67	3,21
400,00	28	28	36	30,67	4,62
Controle positivo	2AA (2,5 µg/placa)	910	1160	1035	176,78**

[1] D.P. = desvio padrão
** significante a 1%

TABELA 6. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem YG1041, na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP[1]
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	45	43	50	43,60	4,22
	41	39			
0,50	33	49	35	39,00	8,72
1,00	32	48	36	38,67	8,33
5,00	47	39	42	42,67	4,04
10,00	54	42	39	45,00	7,94
Controle positivo	4NOP (10 µg/placa)	950	970	960,00	14,14**
Com S9					
0	50	48	52	51,80	4,82
	49	60			
0,10	51	48	54	51,00	3,00
0,50	42	47	52	47,00	5,00
5,00	60	50	56	55,33	5,03
50,00	58	43	50	50,33	7,51
100,00	48	39	46	44,33	4,73
Controle positivo	2AA (0,0625 µg/placa)	390	310	350	56,57**

[1] D.P. = desvio padrão
** significante a 1%