UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da capacidade de dano ao material genético pelos azo
corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1:
identificação e análise do potencial mutagênico dos seus produtos
de biotransformação**

Farah Maria Drumond Chequer

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da capacidade de dano ao material genético pelos azo
corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1:
identificação e análise do potencial mutagênico dos seus produtos
de biotransformação**

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Farah Maria Drumond Chequer

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.

Chequer, Farah Maria Drumond

Avaliação da capacidade de dano ao material genético pelos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1: identificação e análise do potencial mutagênico dos seus produtos de biotransformação. Ribeirão Preto, 2011.

190 p.: il.; 30 cm.

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

Orientadora: Oliveira, Danielle Palma

1. Disperse Red 1 – 2. Disperse Red 13 – 3. Disperse Orange 1 – 4. Oxidação – 5. Redução – 6. Aminas aromáticas – 7. Mutagenicidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Farah Maria Drumond Chequer

Avaliação da capacidade de dano ao material genético pelos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1: identificação e análise do potencial mutagênico dos seus produtos de biotransformação

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

É com muito orgulho que dedico o presente trabalho aos eternos amores da minha vida, meus pais e minhas irmãs, que são exemplos de amor, respeito, dedicação, dignidade e vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por ser uma pessoa tão abençoada!

Aos meus exemplos de vida, força e determinação, **Chaue Chequer** e **Maria Adelaide**, e às queridas irmãs, **Fádua** e **Farissa**, pelo amor incondicional e pela fundamental presença em todos os momentos. Vocês são o meu alicerce, a minha felicidade, o meu porto seguro, enfim, a minha vida. Eu nunca conseguiria vencer mais essa etapa sem vocês.

À Professora **Dra. Danielle Palma de Oliveira**, minha orientadora, pela amizade, paciência e ensinamentos fundamentais para a concretização desse sonho. Foram cinco anos de convivência inesquecíveis, os quais me proporcionaram crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada por todos os incentivos e pela força nos momentos de insegurança.

Ao Professor **Dr. Norberto Peporine Lopes**, por toda ajuda, atenção e colaboração durante a execução da pesquisa.

Aos tios e tias **Faiçal**, **Dione**, **Ânuar** e **Júnia**, pelo apoio de sempre, especialmente nos momentos mais difíceis.

À minha madrinha **Maria José**, por me colocar em todas as suas orações, sempre pedindo a Deus para me guiar e iluminar.

À minha segunda família **Lezenita**, **Débora** e **Fábio Alexandre**, pelo amor e pela essencial presença em minha vida.

Aos primos e primas, **Túlio**, **Taciana**, **Trícia**, **Karen**, **Lílian** e **Faiçal Filho**, pelo constante incentivo, pelos bons conselhos e pelos momentos alegres em família.

Ao meu cunhado **Hamilton**, pela solidariedade em todos os momentos.

Ao meu namorado **André**, pelo amor, presença essencial e exemplo de determinação e dedicação. Eu tenho um orgulho imenso de você!

À terceira família que agora faz parte da minha vida, **Vó Maura, Vô Antônio, Sr. Jacob, D. Lina, Nayara e João Marcos**, pela amizade, carinho, constante incentivo e orações.

Às amigas desde a graduação, **Elisa, Lizziane e Lidiane**, cuja amizade e companheirismo levarei por toda a minha vida. Vocês estão em meu coração!

Às amigas, **Gisele, Thalita, Eloísa, Gabriela, Alecssandra, Dani Leme e Dani IC**, pelo apoio, disposição em ajudar e momentos de distração no laboratório, e especialmente à **Thalita**, que me acolheu diversas vezes em sua casa em Araraquara, pela amizade, pela atenção e por compartilhar comigo o conhecimento de muitas técnicas.

Aos amigos, **Thiago e Rafael**, pelos conhecimentos transmitidos e pela ajuda na execução deste trabalho.

Aos amigos **Klaus e Daniel**, pela colaboração e pelo constante apoio.

Aos amigos **Camilo, Gláucia, Andréia, Fernando e Gabriela**, pelo carinho, atenção e incentivo.

Às amigas da Secretaria de Pós-graduação, **Ana Lúcia, Rosana e Rosemary**, pela fundamental ajuda e, principalmente, pela atenção, carinho e paciência. Vocês são muito especiais!

Às amigas que me acompanham desde a infância, **Thays, Ana Cecília e Aline**, pela amizade, presença, alegria e incentivo em todos os momentos.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste sonho.

Muito obrigada! Sempre!!!

"Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro de seu coração."

Dalai Lama

"A dúvida é o princípio da sabedoria".

Aristóteles

RESUMO

CHEQUER, F.M.D. **Avaliação da capacidade de dano ao material genético pelos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1: identificação e análise do potencial mutagênico dos seus produtos de biotransformação.** 2011. 190 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Atualmente, a utilização de azo corantes por vários ramos industriais constitui um problema ambiental e de saúde pública, tendo em vista o lançamento de quantidades elevadas para o meio ambiente e a falta de dados toxicológicos a cerca dos corantes e de seus metabólitos gerados, principalmente, após os processos de oxidação e redução. Nosso grupo realizou ensaios com micronúcleos em linfócitos humanos e em células HepG2 e ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, demonstrando que os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 são mutagênicos para os diferentes parâmetros. Dessa forma, neste trabalho foi avaliada a capacidade de ligação dos corantes originais com o DNA e a base nitrogenada guanosina, a fim de elucidar o mecanismo de ação mutagênica. Adicionalmente, foi realizada a análise do potencial mutagênico do corante Disperse Red 1 e de seus metabólitos por meio do teste de mutação gênica em células de linfomas de camundongo (*Mouse Lymphoma Assay*), e também foram avaliados os produtos de oxidação e redução dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, por meio do teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*. Posteriormente, foi investigada a possível formação de aminas aromáticas e de outros compostos, após os ensaios eletroquímicos e reação com S9, utilizando CLAE/DAD e CG/EM. Nossos resultados mostraram que a formação de adutos com o DNA, especificamente com a base guanosina, não é o mecanismo de ação tóxica preferencial para os azo corantes estudados. O corante Disperse Red 1 e seus produtos de biotransformação apresentaram resultados negativos no teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongos. No entanto, tanto os produtos de oxidação como os de redução dos três corantes estudados apresentaram potencial mutagênico ao serem testados no Ensaio *Salmonella*/microsoma. Os produtos identificados após a oxidação química e enzimática (utilizando S9) e redução química dos três corantes estudados foram: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, 2-cloro-4-nitro-benzamina, benzamina, nitrobenzeno, 4-nitro-benzamina, 2-(etilfenilamino)-etanol, N-fenil-benzamina, N-fenil-1,4-benzenodiamina. Portanto, nossos dados mostram que a exposição por via oral a esses corantes tem relevância toxicológica, visto que podem causar danos à saúde não somente pela exposição aos corantes inalterados, mas também devido à formação de produtos tóxicos após a biotransformação. Cabe ressaltar que os corantes estudados no presente trabalho são amplamente utilizados por indústrias têxteis no Brasil, o que pode levar à contaminação de águas e alimentos.

Palavras-chave: Disperse Red 1. Disperse Red 13. Disperse Orange 1. Oxidação. Redução. Aminas aromáticas. Mutagenicidade.

ABSTRACT

CHEQUER, F.M.D. **Capacity assessment of damage to the genetic material by the azo dye Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1: identification and analysis of mutagenic potential of its biotransformation products.** 2011. 190 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Currently, the use of azo dyes by various industries is an environmental problem and public health, considering the release of large quantities to the environment and the lack of toxicological data about the dyes and their metabolites generated, especially after the processes of oxidation and reduction. Our group carried out micronuclei assay in human lymphocytes and HepG2 cells and mutagenicity test with *Salmonella typhimurium*, indicating that the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1 are mutagenic to the different parameters. Thus, this study evaluated the binding capacity of the original dyes with DNA and nitrogenous base guanosine in order to elucidate the mechanism of mutagenic action. Additionally, we performed the analysis of mutagenic potential of Disperse Red 1 dye and its metabolites using Mouse Lymphoma Assay, and also evaluated the products of oxidation and reduction of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1, using the mutagenicity test with *Salmonella typhimurium*. Also it was investigated the possible formation of aromatic amines and other compounds after the electrochemical assays and reaction with S9, using HPLC / DAD and GC / MS. Our results showed that the formation of adducts with DNA, specifically with the guanosine base is not the preferred mechanism of toxic action for the azo dyes studied. The dye Disperse Red 1 and its biotransformation products had negative results in the mouse lymphoma assay. However, both the products of oxidation and the reduction of three dyes studied showed mutagenic potential in the *Salmonella*/microsome assay. The products identified after chemical and enzymatic oxidation (using S9) and chemical reduction of three dyes studied were: sulfate 2-[(4-aminophenyl)ethylamino]-Ethanol monohydrate, 2-chloro-4-nitro-benzamine, benzamine, nitrobenzene, 4-nitro-benzamine, 2-(ethylphenylamino)-Ethanol, N-phenyl-benzamine, N-phenyl-1,4-benzenediamine. Therefore, our data show that oral exposure to these dyes have toxicological significance, since it can cause damage to health not only by exposure to dyes unchanged, but also due to the formation of toxic products after the biotransformation. It is noteworthy that the dyes studied in this work are widely used by textile industries in Brazil, which can lead to contamination of food and water.

Keywords: Disperse Red 1. Disperse Red 13. Disperse Orange 1. Oxidation. Reduction. Aromatic amines. Mutagenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Processo de C-Hidroxilação (Hidroxilação do anel) de azo corantes	9
Figura 2.	N-hidroxilação de um corante do tipo azo, seguida da conjugação e posterior formação de um composto nitrênio ..	10
Figura 3.	Reação de um composto nitrênio com o DNA (Guanosina) ..	10
Figura 4.	Processo de Desmetilação (metabolismo oxidativo) de um corante do tipo azo	11
Figura 5.	Redução de azo corantes a partir da ação de azoredutases da microflora intestinal, seguida da ação de acetiltransferases e citocromo P450	12
Figura 6.	Processo de redução metabólica de um corante azo aromático	13
Figura 7.	Estrutura química dos azo corantes selecionados como modelo: (A) Disperse Red 1, (B) Disperse Red 13, (C) Disperse Orange 1.	19
Figura 8.	Plaqueamento para determinação da resistência ao 5-Trifluorotimidina.....	29
Figura 9.	Espectro das variadas concentrações do DNA em DMSO ...	48
Figura 10.	Espectro do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO mais adição de 0,15 mgDNA/mL, 0,225 mgDNA/mL e 0,3 mgDNA/mL	48
Figura 11.	Espectro do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO mais adição de 0,15 mgDNA/mL, 0,225 mgDNA/mL e 0,3 mgDNA/mL	49
Figura 12.	Espectro do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO mais adição de 0,15 mgDNA/mL, 0,225 mgDNA/mL e 0,3 mgDNA/mL	49
Figura 13.	Espectro do corante Disperse Red 1 a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L em DMSO mais adição de $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L de guanosina	50
Figura 14.	Espectro do corante Disperse Red 13 a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L em DMSO mais adição de $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L de guanosina ...	51
Figura 15.	Espectro do corante Disperse Orange 1 a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L em DMSO mais adição de $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L de guanosina ...	51

Figura 16.	Mutagenicidade do Corante Disperse Red 1 sobre as células L5178Y/Tk ^{+/−} de linfoma de camundongo.....	53
Figura 17.	Mutagenicidade dos Produtos de Oxidação do Corante Disperse Red 1 sobre as células L5178Y/Tk ^{+/−} de linfoma de camundongo	54
Figura 18.	Mutagenicidade dos Produtos de Redução do Corante Disperse Red 1 sobre as células L5178Y/Tk ^{+/−} de linfoma de camundongo	56
Figura 19.	Comparação do perfil de mutagenicidade dos Produtos de Oxidação do corante Disperse Red 1, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B)	57
Figura 20.	Comparação do perfil de mutagenicidade dos Produtos de Redução do corante Disperse Red 1, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B)	58
Figura 21.	Comparação dos resultados obtidos pelo corante Disperse Red 1 original, oxidado e reduzido	59
Figura 22.	Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 13, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B)	60
Figura 23.	Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Red 13, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B)	60
Figura 24.	Comparação dos resultados obtidos pelo corante Disperse Red 13 original, oxidado e reduzido	61
Figura 25.	Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Orange 1, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B)	62
Figura 26.	Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Orange 1, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B)	62
Figura 27.	Comparação dos resultados obtidos pelo corante Disperse Orange 1 original, oxidado e reduzido.....	63
Figura 28.	Espectro do corante Disperse Red 1 solubilizado em DMSO	65
Figura 29.	Espectro do corante Disperse Red 13 solubilizado em DMSO	66

Figura 30.	Espectro do corante Disperse Orange 1 solubilizado em DMSO	66
Figura 31.	Resultados obtidos após a reação do corante Disperse Red 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) com 300 μ L de S9 (4% v/v).....	67
Figura 32.	Resultados obtidos após a reação do corante Disperse Red 13 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) com 300 μ L de S9 (4% v/v).....	68
Figura 33.	Resultados obtidos após a reação do corante Disperse Orange 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) com 300 μ L de S9 (4% v/v)	68
Figura 34.	Espectros obtidos durante a oxidação eletroquímica do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ (0,1 mol/L)	70
Figura 35.	Monitoramento da ligação azo (cromóforo) durante a reação de oxidação do corante Disperse Red 1	71
Figura 36.	Espectro do Corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ antes da oxidação (A=1,004) e após 50 minutos de oxidação (A= 0,374).....	71
Figura 37.	Espectros obtidos durante a redução eletroquímica do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ (0,1 mol/L).....	72
Figura 38.	Espectros obtidos durante a redução do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/ TBABF ₄ (0,1 mol/L), acrescido de 0,3 % de ácido acético	73
Figura 39.	Espectros do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ (0,1 mol/L) antes da redução (A=1,193) e após 60 minutos de redução (A= 0,825).....	73
Figura 40.	Espectros obtidos durante a oxidação do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ (0,1 mol/L).....	74
Figura 41.	Monitoramento da ligação azo (cromóforo) durante a reação de oxidação do corante Disperse Red 13	75
Figura 42.	Espectro do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ (0,1 mol/L) antes da oxidação (A=0,599) e após 60 minutos de oxidação (A= 0,188)	75
Figura 43.	Espectros obtidos durante a redução eletroquímica do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/ TBABF ₄ (0,1 mol/L), acrescido de 0,3 % de ácido acético. ...	76

Figura 44.	Espectros do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/ TBABF ₄ (0,1 mol/L) antes da redução (A=0,766) e após 80 minutos de redução (A= 0,464).....	77
Figura 45.	Espectros obtidos durante a oxidação eletroquímica do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ (0,1 mol/L)	78
Figura 46.	Monitoramento ligação azo (cromóforo) durante a reação de oxidação do corante Disperse Orange 1	79
Figura 47.	Espectro do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF ₄ (0,1 mol/L) antes da oxidação (A=0,792) e após 38 minutos de oxidação (A= 0,276)	79
Figura 48.	Espectros obtidos durante a redução simultânea do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/ TBABF ₄ (0,1 mol/L) mais 0,3 % de ácido acético.....	80
Figura 49.	Espectros do Corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/ TBABF ₄ (0,1 mol/L) antes da redução (A=0,720) e após 70 minutos de redução (A= 0,455).....	81
Figura 50.	Espectros de absorção na região UV-VIS durante a oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1 em DMSO/TBABF ₄ 0,01 mol/L	82
Figura 51.	Cromatograma de oxidação $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1.	83
Figura 52.	Espectros de absorção na região UV-VIS durante a redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1 em DMSO/TBABF ₄ 0,01 mol/L	84
Figura 53.	Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1	85
Figura 54.	Espectros de absorção na região UV-VIS durante a oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13 em DMSO/TBABF ₄ 0,01 mol/L	86
Figura 55.	Cromatograma de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13.....	87
Figura 56.	Espectros de absorção na região UV-VIS de durante a redução $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13 em DMSO/TBABF ₄ 0,01 mol/L	88
Figura 57.	Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13.....	89

Figura 58.	Espectros de absorção na região UV-VIS durante a oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1 em DMSO/TBABF ₄ 0,01 mol/L	90
Figura 59.	Cromatograma de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1	91
Figura 60.	Espectros de absorção na região UV-VIS durante a redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1 em DMSO/TBABF ₄ 0,01 mol/L	92
Figura 61.	Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1	93
Figura 62.	Cromatograma do produto de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1 a potencial controlado por 2,5 horas	94
Figura 63.	Cromatograma do produto de oxidação pelo S9 de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1	94
Figura 64.	Cromatograma do produto de redução eletroquímica a potencial controlado de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1	95
Figura 65.	Cromatograma do produto de oxidação a potencial controlado de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13	95
Figura 66.	Cromatograma do produto de oxidação pelo S9 de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13	96
Figura 67.	Cromatograma do produto de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13	96
Figura 68.	Cromatograma do produto de oxidação a potencial controlado de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1	97
Figura 69.	Cromatograma do produto de oxidação pelo S9 de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1	97
Figura 70.	Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características genéticas das linhagens de <i>S. typhimurium</i> utilizadas no teste <i>Salmonella</i> /microsoma	18
Tabela 2-	Toxicidade e mutagenicidade em células de linfomas de camundongo após tratamento com o corante Disperse Red 1	52
Tabela 3-	Toxicidade e mutagenicidade em células de linfomas de camundongo após tratamento com os produtos resultantes da oxidação do corante Disperse Red 1	54
Tabela 4-	Toxicidade e mutagenicidade em células de linfomas de camundongo após tratamento com os produtos resultantes da redução do corante Disperse Red 1.....	55
Tabela 5-	Resultados de mutagenicidade dos produtos de oxidação e redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, para as linhagens TA98 e YG1041	63
Tabela 6-	Viabilidade das linhagens no experimento feito com os produtos de oxidação dos três corantes estudados.....	64
Tabela 7-	Viabilidade das linhagens no experimento feito com os produtos de redução dos três corantes estudados	64
Tabela 8-	Estrutura química e os tempos de retenção dos produtos gerados após a oxidação e a redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 pela análise no CLAE/DAD	99
Tabela 9-	Parâmetros correspondentes às respectivas curvas analíticas obtidas para cada padrão selecionado por CLAE/DAD	100
Tabela 10-	As concentrações em mol/L de cada produto formado após a oxidação e a redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1	101
Tabela 11-	Estrutura química e os tempos de retenção dos produtos gerados após a oxidação e redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 obtidos após a injeção das soluções dos corantes a 6×10^{-3} mol/L no CG/EM	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CDC	Crescimento Diário Celular
CG/EM	Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa
CLAE/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos
CTR	Crescimento Total Relativo
CS	Crescimento em Suspensão
CSR	Crescimento em Suspensão Relativo
CYP - P450	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP	Eficiência de Plaqueamento/clonação
FAG	Fator de Avaliação Global
FM	Frequência de Mutação
FME	Frequência de Mutação Espontânea
FMI	Frequência de Mutação Induzida
IWGT	<i>International Workshop on Genotoxicity Tests</i>
M	Molaridade
MLA	<i>Mouse Lymphoma Assay</i>
MNs	Micronúcleos
NADP	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
TBABF ₄	tetrafluorborato de tetrabutylamônio
TFT	5-Trifluorotimidina
t _R	Tempo de retenção
UV-Vis	Ultra-violeta visível
VR	Viabilidade relativa

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Azo Corantes e seus efeitos mutagênicos	4
1.2 A formação dos metabólitos oriundos dos azo corantes e os seus efeitos	6
1.2.1 Rotas Metabólicas envolvidas na Redução e Oxidação dos Azo Corantes	7
1.2.1.1 Metabolismo Oxidativo	8
1.2.1.2 Metabolismo Redutivo	11
1.3 Avaliação dos danos induzidos pelos corantes e por seus produtos de biotransformação ao material genético	14
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Corantes estudados	24
3.2 Métodos.....	25
3.2.1 Avaliação dos danos ao material genético	25
3.2.1.1 Reação dos Corantes com o DNA e a Guanosina	25
3.2.1.2 Ensaio de Mutação Gênica em Células de Linfoma de Camundongo	26
3.2.1.3 Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma	33
3.2.2 Investigação das vias metabólicas dos corantes.....	41
3.2.2.1 Oxidação pelo sistema de metabolização microsomal de fígado de rato (mistura S9).....	42
3.2.2.2 Oxidação e redução espectroeletroquímica dos corantes.....	43
3.2.2.3 Eletrólise a Potencial Controlado	44
3.2.3 Identificação dos produtos formados.....	44
4. RESULTADOS.....	47
4.1 Avaliação da capacidade de dano ao material genético dos corantes originais e de seus produtos obtidos após os processos de oxidação e redução	47

4.1.1 Reação dos corantes originais com o DNA e com a base nitrogenada guanosina.....	47
4.1.2 Avaliação da mutagenicidade do Corante Disperse Red 1 e de seus produtos de oxidação e redução utilizando o Ensaio de Mutação Gênica em Células de Linfoma de Camundongo (<i>Mouse Lymphoma Assay</i>).....	52
4.1.3 Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação e redução utilizando o Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma	56
4.2 Perfil espectrofotométrico dos corantes originais	64
4.3 Metabolização dos corantes por meio da mistura S9 <i>in vitro</i>	67
4.4 Simulação de reações de oxidação e redução <i>in vitro</i> dos corantes estudados por espectroeletroquímica	69
4.4.1 Caracterização espectroeletroquímica dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Red 1	69
4.4.2 Caracterização espectroeletroquímica dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Red 13.....	74
4.4.3 Caracterização espectroeletroquímica dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Orange 1	77
4.5 Eletrólise a Potencial Controlado	81
4.5.1 Perfil espectrofotométrico na região UV-VIS e análise por CLAE/DAD dos produtos resultantes das reações de oxidação e de redução a potencial controlado dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1	82
4.6 Identificação das aminas e de outros produtos formados após os processos de oxidação e redução	93
5. DISCUSSÃO	106
6. CONCLUSÕES	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
APÊNDICES	133
Apêndice A - Dados brutos dos experimentos com os produtos de oxidação dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 utilizando o Teste de Ames	
Apêndice B - Dados brutos dos experimentos com os produtos de redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 utilizando o Teste de Ames	
Apêndice C - Curvas Analíticas	
Apêndice D - Análise pelo CLAE/DAD para identificar outras possíveis aminas	
Apêndice E - Propostas de Fragmentação dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1	

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Há mais de 20 mil anos, o homem utiliza as cores, sendo que o Negro-de-Fumo (*Carbon Black*) foi o primeiro corante de que se tem conhecimento. Com o tempo, muitos corantes naturais foram sendo descobertos e eram utilizados não somente por motivos estéticos, mas também como símbolo de honra e prestígio. Na Roma Antiga, a cor púrpura, obtida de um molusco marinho chamado Murex, era símbolo de riqueza e distinção, e, portanto, utilizada nas vestes reais. Outro corante muito utilizado era o índigo, extraído da planta *Isatis tinctoria*, conhecido desde os egípcios até os bretões (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA [ABIQUM], 2006).

Por volta de 3.000 a.C., surgiram alguns corantes inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio. Em 1856, William H. Perkin sintetizou o primeiro corante orgânico, conhecido como Mauve, por meio da oxidação da fenilamina (anilina) com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (ABIQUM, 2006). A partir desta época, milhares de corantes orgânicos têm sido sintetizados, visando atender às exigências do mercado consumidor em relação à estabilidade das cores nas fibras. Além disso, juntamente com o crescimento da indústria têxtil em todo o mundo, ocorreu um aumento proporcional no uso destes compostos, e isto tem sido acompanhado por um aumento da poluição, devido aos efluentes contaminados com essas substâncias (PANDEY et al., 2007; SARATELE et al., 2011).

Os corantes sintéticos são usados extensivamente nas indústrias têxteis, farmacêuticas e alimentícias; na impressão de papel e fotografia; e produtos a base de petróleo (COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997; RAJAGURU et al., 1999). Estima-se que aproximadamente 10^9 kg de corantes são produzidos anualmente no mundo, sendo que os dois grupos mais utilizados na coloração de diferentes grupos têxteis são azo e antraquinona (KRIŽANEC; MARECHAL, 2006; FORSS; WELANDER, 2011). Do montante destes corantes, 10 a 15 % são descartados no meio ambiente, devido à relativa baixa fixação destes compostos nas fibras (RAJAGURU et al., 1999; NAM; RENGANATHAN, 2000), tornando esta classe um problema ambiental bastante preocupante.

Em 1974, após a formação da *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry* (ETAD), foram estabelecidos objetivos para minimizar os danos ambientais, proteger os consumidores e cooperar plenamente com as preocupações do governo e do público sobre o impacto toxicológico dos

seus produtos (ANLIKER, 1979; ROBINSON et al., 2001). Dentro desse contexto, a ETDA avaliou 4.000 corantes, e destes mais de 90% apresentaram valores DL_{50} superiores a 2×10^3 mg/kg, sendo que as maiores taxas de toxicidade foram encontradas entre os corantes básicos e diazo diretos (ROBINSON et al., 2001). Desta forma, foi demonstrada que a toxicidade aguda destes xenobióticos não é relevante. Porém, o grande interesse da Toxicologia por estes compostos se deve às exposições crônicas a baixas concentrações. A exposição a alguns azo corantes tem sido relacionada ao desenvolvimento de câncer de bexiga em humanos, sarcomas esplênicos, hepatocarcinomas e anomalias nucleares em animais experimentais e aberrações cromossômicas em células de mamíferos (PERCY; MOORE; CHIPMAN, 1989; MANSOUR et al., 2007).

O extenso uso dos azo corantes está relacionado ao grau de industrialização da sociedade. Assim, desde a década de 70, observou-se que a incidência de câncer intestinal era mais comum nas sociedades altamente industrializadas, e, conseqüentemente, poderia existir uma conexão entre o aumento do número de casos de câncer e o uso dos azo corantes (CHUNG; FULK; ANDREWS, 1978). Dessa maneira, os corantes passaram a ser considerados não só um problema ambiental, mas também de saúde pública.

A preocupação ambiental com a presença dos corantes em corpos d' água, principalmente aqueles que serão utilizados para captação e produção de água tratada para consumo humano, reside no fato de que as populações podem se expor por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. Como será apresentado mais adiante neste trabalho, após a ingestão, esses compostos podem ser metabolizados gerando produtos tóxicos, principalmente aqueles que contêm o grupo azo como cromóforo, que após a clivagem podem gerar aminas aromáticas mutagênicas e/ou carcinogênicas (VENTURINE; TAMARO, 1979; PRIVAL; MITCHELL, 1982; FREEMAN; ESANCY; CLAXTON, 1990).

A absorção de azo corantes também pode acontecer após a exposição da pele em ambientes ocupacionais ou durante a utilização de cosméticos. Nos anos 80, a absorção percutânea desses corantes por meio da maquiagem facial foi considerada como um fator de risco de incapacidades reprodutivas e aberrações cromossômicas em uma população de locutores de televisão empregados no Centro de Televisão de Praga, na República Tcheca (KUČEROVÁ et al., 1987; COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993).

Assim, é importante conhecer não somente a toxicidade dos corantes originais, mas também de seus produtos de metabolismo, considerando que o tratamento convencional aplicado pelas Estações de Tratamento de Águas não são capazes de remover grande parte desses compostos e, conseqüentemente, podem ser encontrados na água tratada (OLIVEIRA et al., 2007).

1.1 Azo Corantes e seus efeitos mutagênicos

Os azo corantes consistem em uma amina diazotada acoplada a outra amina ou a um fenol, e esta classe é caracterizada pela presença de um ou mais grupamentos azo ($N=N$) (BAE; FREEMAN, 2007; KUSIC et al., 2011). Estes corantes são largamente utilizados por diversos ramos industriais e na década de 80 correspondiam a aproximadamente 70% dos corantes utilizados mundialmente por peso (ZOLLINGER, 1987).

Os azo compostos são considerados a classe química mais importante para a indústria de tingimento, principalmente de náilon e poliéster, por serem economicamente mais viáveis do que as demais e por exibirem a maior variedade de cores (BAE; FREEMAN, 2007; KUSIC et al., 2011; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997; GUARATINI; ZANONI, 2000). Além da aplicação na indústria têxtil, essa classe de corantes é bastante utilizada pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos, bem como na impressão e fabricação de papel (CHUNG; STEVENS, 1993; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997; CHANG et al., 2001).

Os azo corantes exibem grande variedade de cores e representam mais do que 50% de todos os corantes produzidos anualmente (CARLIELL et al., 1995; BAE; FREEMAN, 2007; KUSIC et al., 2011). Apresentam boa fixação às fibras, em comparação com outros corantes sintéticos, porém, esta fixação é de no máximo 85%. Este fato explica a grande quantidade de corantes perdidos para o meio ambiente (10 a 15%) (RAJAGURU et al., 1999; NAM; RENGANATHAN, 2000), anteriormente citada. Assim, estima-se que 280.000 toneladas de corantes têxteis são descartadas pelos efluentes industriais (MAAS, CHAUDHARI, 2005; JIN et al., 2007; SARATELE et al., 2011). Além disso, boa parte dos representantes desta classe resiste aos tratamentos convencionais tanto de efluentes industriais como de água tratada (UMBUZEIRO et al., 2005a). Um estudo conduzido por Shaul et al. (1991) mostrou que dos 18 azo corantes estudados, 11 passaram através do

processo de Lodo Ativado praticamente inalterados, 4 foram adsorvidos no lodo e somente 3 foram biodegradados, acarretando o lançamento destas substâncias em corpos d'água. Oliveira e colaboradores (2007) mostraram que o efluente tratado de uma indústria de tingimento era mutagênico e continha diversos tipos de corantes. Esses dados são preocupantes considerando que o efluente desta mesma indústria foi estudado por Lima et al. (2007), que observaram que ratos Wistar expostos a esta amostra apresentaram aumento na incidência de criptas aberrantes no cólon, que é um biomarcador precoce de carcinogenicidade.

Muitos corantes do tipo azo têm mostrado resultados positivos em diferentes parâmetros. Tsuboy et al. (2007), analisaram os efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos do azo corante CI Disperse Blue 291 e os resultados obtidos mostraram claramente que esse azo corante causou efeitos dose-dependentes, induzindo à formação de micronúcleos (MNs), fragmentação de DNA e aumento do índice apoptótico em células de hepatoma humano (HepG₂).

Vários azo corantes mostraram respostas positivas para mutagenicidade em ensaios com *Salmonella* e em testes com mamíferos, e seus potenciais dependem da natureza e da posição dos substituintes em relação tanto aos anéis aromáticos como ao átomo de nitrogênio do grupo amino. Por exemplo, 3-metoxi-4-aminoazobenzeno é um potente hepatocarcinógeno em ratos e forte mutágeno em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, enquanto que 2-metoxi-4-aminoazobenzeno é aparentemente não carcinogênico e um mutágeno extremamente fraco sob condições similares (HASHIMOTO; WATANABE; DEGAWA, 1977; ESANCY; FREEMAN; CLAXTON, 1990; GARG; BHAT; BOCK, 2002; FERRAZ et al., 2010). Ademais, Ferraz et al. (2010) estudou a mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 por meio do Teste de Ames, e perceberam que o substituinte Cl no corante Disperse Red 13 diminuiu a mutagenicidade deste 32 vezes com a linhagem TA98 e 14 vezes com a linhagem YG1041, quando comparado com o corante Disperse Red 1 (FERRAZ et al., 2010). Adicionalmente, os corantes Acid Red 18 e Acid Red 17 são não mutagênicos, enquanto que o corante estruturalmente similar Acid Red 26 é reportado como carcinogênico somente devido à incorporação de um grupo metil e à alteração da posição do sulfonato de sódio (FREEMAN; ESANCY; CLAXTON, 1990).

Chung e Cerniglia (1992) fizeram uma revisão sobre vários corantes azoicos já avaliados pelo ensaio *Salmonella*/microssoma. De acordo com esta revisão, todos

os azo corantes avaliados contendo o grupamento nitro apresentaram atividade mutagênica. Os corantes Acid Alizarin Yellow R e Acid Alizarin GG apresentaram este efeito na ausência de ativação metabólica (BROWN; ROEHM; BROWN, 1978). Já os corantes C.I. Basic Red 18 e Orasol Navy 2RB foram mutagênicos tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica (VENTURINI; TAMARO, 1979; NESTMANN; KOWBEL; WHEAT, 1981).

Al-Sabti (2000) demonstrou que o corante têxtil azo reativo Clorotriazina Red 120 (CRARD-120) apresentou atividade mutagênica no ensaio de indução de MNs em eritrócitos de carpa prussiana (*Carassius auratus gibelio*). Além disso, apresentou atividade clastogênica, o que é um potente fator de risco no desenvolvimento de doenças genéticas, teratogênicas ou carcinogênicas de populações de peixes. Consequentemente, efeitos desastrosos podem ser provocados no ecossistema aquático, já que o destino desses compostos são os efluentes despejados em recursos hídricos (AL-SABTI, 2000).

Outro estudo demonstrou a clastogenicidade *in vivo* do azo corante Direct Red 2 (DR2) no teste de micronúcleo em medula óssea de rato, e ainda levantou dados para discutir a cerca do seu potencial carcinogênico humano, tanto na forma inalterada quanto na forma de metabólitos. Além dos efeitos relacionados à exposição por meio de águas e alimentos contaminados, a exposição a estes compostos também se estende às pessoas que lidam com esse produto no ambiente de trabalho por meio da absorção dérmica do corante (RAJAGURU et al., 1999). Assim, pode-se inferir que não só os corantes originais são potencialmente tóxicos, mas também seus produtos de biotransformação devem ser avaliados.

1.2 A formação dos metabólitos oriundos dos azo corantes e os seus efeitos

Os primeiros estudos sobre o metabolismo dos compostos azoicos em mamíferos foram realizados por Sisley e Porscher em 1911. Esses pesquisadores identificaram o ácido sulfanílico na urina de cães alimentados com o corante Orange I e demonstraram, pela primeira vez, que os azo compostos poderiam ser metabolizados pela clivagem redutiva do grupo azo (SISLEY; PORSCHER, 1911¹ apud WALKER, 1970, p. 659).

---

¹ Sisley, P.; Porscher, C. Du sort des matières colorantes darts l'organisme animal. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, Paris, v. 152, p. 1062, 1911

Os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e tóxicos de azo corantes podem decorrer da ação direta do próprio agente ou da formação de radicais livres e derivados aril aminas, gerados durante a biotransformação redutiva da ligação azo (CHUNG; STEVENS; CERNIGLIA, 1992; COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993; RAJAGURU et al., 1999) ou de produtos obtidos após a oxidação via citocromo P450 (FUJITA; PEISACH, 1978; ARLT et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005b).

Consequentemente, um dos critérios para classificar um corante como prejudicial ao ser humano é a sua habilidade em clivar redutivamente formando aminas aromáticas em contato com o suor, saliva ou suco gástrico (PIELESZ, 1999, 2002). Algumas dessas aminas aromáticas são carcinogênicas e são capazes de acumular em cadeias alimentares, como por exemplo, as bifenilaminas, tais como benzidinas e 4-bifenilaminas, que estão presentes no meio ambiente e, portanto, constituem uma ameaça à saúde humana e aos ecossistemas em geral (CHOUHDARY, 1996; CHUNG; HUGLES; CLAXTON, 2000). A Benzidina, uma amina aromática gerada após a biotransformação de vários corantes do tipo azo, é conhecida por causar câncer de bexiga em humanos e roedores e é carcinogênica para alguns tecidos, incluindo o fígado e o intestino (PERCY; MOORE; CHIPMAN, 1989).

É importante ressaltar que após a exposição aos azo corantes, seja por via oral ou dérmica, os humanos podem se expor aos produtos de biotransformação dos corantes gerados tanto por ação de microorganismo na flora intestinal e da pele, como após reações hepáticas (CHADWICK, GEORGE, CLAXTON, 1992; STAHLMANN et al., 2006). Tal biotransformação pode ocorrer em uma ampla variedade de mamíferos, incluindo tanto o macaco *Rhesus* (PRIVAL; MITCHEL, 1982) como os humanos (WATABE et al., 1980).

1.2.1 Rotas Metabólicas envolvidas na Redução e Oxidação dos Azo Corantes

Os corantes comportam-se como xenobióticos em geral. Após serem absorvidos, eles se distribuem através do organismo, onde exercem algum tipo de ação ou se tornam alvo de mecanismos metabólitos secundários. Esses mecanismos podem produzir compostos menos nocivos, entretanto, podem formar xenobióticos bioativos, ou seja, com maior toxicidade (KLEINOW; MELANCON; LECH, 1987; LIVINGSTONE, 1998). As principais rotas de biotransformação de

corantes são processos envolvendo oxidação, redução, hidrólise e conjugação, os quais são catalisados enzimaticamente (ZOLLINGER, 1991; HUNGER, 1994; ZBAIDA, 1995). No entanto, em humanos a redução e a oxidação biológica de um azo corante são responsáveis pela possível presença de aminas tóxicas no organismo (PIELESZ et al., 2002).

As vias metabólicas seguidas por um azo corante dependerá de vários fatores, tais como: (a) o modo de administração; (b) o grau de absorção do trato gastrointestinal após a administração oral; (c) a extensão da excreção biliar, especialmente após a exposição por outras vias, diferentes da oral; (d) as diferenças genéticas na ocorrência e na atividade do sistema de redução enzimática no fígado; (e) diferenças de espécies na flora intestinal; (f) a atividade e a especificidade relativas dos sistemas hepático e intestinal, particularmente aquelas responsáveis pela redução da ligação azo. Importante lembrar que todos esses fatores estão inter-relacionados (WALKER, 1970).

1.2.1.1 Metabolismo Oxidativo

Compostos com grande solubilidade lipídica são preferencialmente biotransformados por reações oxidativas. Por exemplo, azo corantes com estruturas químicas contendo grupos amino, alquilamino ou acetilamino, sem nenhum grupo sulfonado, são mais propensos à intensa ação do metabolismo oxidativo (HUNGER, 1994).

Processos oxidativos são catalisados principalmente pelo sistema monooxigenase microsomal, representado pelo citocromo P450 (HUNGER, 1994). As isoenzimas do citocromo P450 pertencem a uma superfamília de heme proteínas que estão presentes em todos os organismos vivos. Ademais, estão envolvidas no metabolismo de uma ampla variedade de compostos químicos (DENISOV et al., 2005; MANSUY, 2007).

O mecanismo geral da oxidação metabólica ocorre por meio de uma cadeia transportadora de elétrons que, primeiramente, transfere um elétron para o complexo P-450-Fe³⁺, o qual sofre redução e promove a entrada de oxigênio no substrato, liberando o produto oxidado no organismo. Existem três diferentes processos oxidativos importantes para os azo corantes: C-hidroxilação; N-hidroxilação e Desmetilação (HUNGER, 1994).

A Figura 1 ilustra o processo de **C-hidroxiilação**, que é caracterizado pela hidroxiilação do anel nos azo corantes, provavelmente gerando um epóxido como intermediário da reação de rearranjo ao fenol (HUNGER, 1994).

Figura 1 - Processo de C-Hidroxiilação (Hidroxiilação do anel) de azo corantes. Sendo (A) a reação genérica e (B) exemplos de corantes oxidados via citocromo P450. Fonte: Hunger, 1994 (modificado).

A **N-hidroxiilação** é reconhecida como o primeiro passo na ativação de aminas aromáticas aos seus intermediários reativos (PHILLIPSON; IOANNIDES, 1983). O processo de N-hidroxiilação ocorre em grupos amino primário ou secundário ou em grupos acetilaminos no fígado. Esta reação é seguida por uma esterificação com gluconato ou sulfato. Estes ésteres ativados podem conduzir à excreção de substâncias agora hidrossolúveis ou separar o grupo éster, resultando na formação de um composto nitrênio, conforme mostra Figura 2, sendo que este composto pode ligar covalentemente a um grupo nucleofílico do DNA, como ilustrado com a guanossina na Figura 3 (HUNGER, 1994).

Além disso, a hidroxiilação do anel aromático pode ocorrer não somente antes da quebra redutiva do grupo azo, mas também sobre as aminas produzidas por essa redução. Essa via parece ser muito importante em compostos que contêm um radical fenila não-sulfonado (WALKER, 1970).

Figura 2 - N-hidroxilação de um corante do tipo azo, seguida da conjugação e posterior formação de um composto nitrênio. Fonte: Hunger, 2004 (modificado).

Figura 3 - Reação de um composto nitrênio com o DNA (Guanosina). Fonte: Hunger, 2004 (modificado).

Por fim, tem-se um último processo oxidativo, a Desmetilação. Nesta etapa ocorre a oxidação do grupo metil de compostos dialquilamino. O N-hidroxi derivado pode ser novamente desmetilado (desmetilação secundária) ou reagir com um composto nitrênio, como ilustra a Figura 4 (HUNGER, 1994).

Figura 4 - Processo de Desmetilação (metabolismo oxidativo) de um corante do tipo azo. Fonte: Hunger, 1994 (modificado).

Por exemplo, foi demonstrado que as reações de N-desmetilação, N-oxidação e esterificação estão envolvidas na ativação de p-dimetilaminoazobenzeno a um agente carcinogênico primário enquanto que a detoxificação está associada com a C-oxidação e a clivagem redutiva da ligação azo (ZBAIDA, 1989).

1.2.1.2 Metabolismo Redutivo

Outra via importante de biotransformação de corantes é a redução, formando, principalmente, aminas aromáticas. Essa reação pode ser catalisada pelas enzimas hepáticas de mamíferos ou pelas bactérias intestinais (FRANCE; CARTER; JOSEPHY, 1986; GOLKA; KOPPS; MYSLAK, 2004). Portanto, essa redução pode produzir compostos que são mais ou menos tóxicos em comparação com a molécula original (RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997), dependendo da estrutura química do metabólito gerado.

Os azo corantes que entram no corpo humano pela ingestão podem ser metabolizados em aminas aromáticas pelas azorredutases dos microorganismos intestinais. Se os azo corantes forem nitro, podem ser metabolizados pelas nitrorredutases produzidas pelos mesmos microorganismos (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992; UMBUZEIRO et al., 2005b). Enzimas hepáticas de mamíferos e outros organismos podem também catalisar a clivagem redutiva da ligação azo e a nitrorredução do grupo nitro, entretanto, tem sido mostrado que as enzimas da microflora intestinal apresentam o mais importante papel neste tipo de metabolismo. Em ambos os casos, se N-hidroxilaminas são formadas, tais compostos são capazes de causar danos ao DNA. Se os corantes são completamente reduzidos a aminas aromáticas, podem ser oxidados também a N-hidroxiderivados pelas enzimas do citocromo P450. Além disso, os radicais N-hidróxi podem ser acetilados pelas enzimas, tais como O-acetiltransferase, gerando

íons eletrofílicos de nitrênio capazes de reagir com o DNA para formar adutos (BARTSCH, 1981; CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992; ARLT et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005b), como mostrado na Figura 5. A geração de espécies reativas de oxigênio também parece estar envolvida na genotoxicidade de aminas O-hidróxi-aromáticas (SWEENEY; CHIPMAN; FORSYTHE, 1994).

É provável que os efeitos tóxicos e/ou carcinogênicos dos azo corantes sejam devido à clivagem redutiva dos produtos, por exemplo: a formação de 1-amino-2-naftol, produzido pela redução do grupo azo do corante Orange II, induziu tumores na bexiga de ratos (BONSER; CLAYSON; JULL, 1963; CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992). Isto sugere que a toxicidade induzida pelas moléculas inalteradas de azo corantes não deveria ser interpretada como único efeito destes compostos, visto que os produtos resultantes da clivagem redutiva desses corantes podem ser mutagênicos/carcinogênicos (FIELD et al., 1977; CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992). Tal fato foi demonstrado em estudos com *Trypan Blue*, o qual é teratogênico e carcinogênico (FIELD et al., 1977). Este corante sozinho não é mutagênico, mas após sofrer redução, este composto produziu um produto mutagênico: O-toluidina (HARTMAN; FULK; ANDREWS, 1978). Conforme já citado, a benzidina gerada após a redução de alguns corantes induz câncer de bexiga em humanos e tumores em alguns experimentos com animais (COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982; CHUNG, 1983).

Figura 5 - Redução de azo corantes a partir da ação de azorredutases da microflora intestinal, seguida da ação de acetiltransferases e citocromo P450. Fonte: Chung; Stevens; Cerneglia, 1992 (modificado).

Segundo Zbaida (1989, 2000), um total de quatro elétrons é requerido para a redução de uma ligação azo a aminas primárias, no entanto a redução microsossomal dos azo corantes, provavelmente, envolve um ciclo de redução de dois elétrons conduzindo à formação do composto intermediário: o hidrazo, conforme mostra a Figura 6. A pesquisa de Zbaida (1989) demonstrou que a hidroxilação de azo corante não reativo, como o azobenzeno, aumenta a sua ligação ao citocromo P-450 microsossomal e, conseqüentemente, a sua taxa de redução.

Figura 6 - Processo de redução metabólica de um azo corante aromático. Fonte: Hunger, 1994 (modificado).

Estudos com corantes mono azo indicaram que a baixa densidade eletrônica na região da ligação azo favorece a redução (WALKER; RYAN, 1971; COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982). Isso pode ser causado pela ligação do hidrogênio a um átomo de nitrogênio do grupo azo juntamente com um grupo naftol proximal, produzindo, assim, uma configuração ceto-hidrazona. É possível que uma estrutura deste tipo, a qual é formada por muitos corantes alimentícios, gere corantes mais resistentes à redução hepática e microbiana (COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982).

Assim, a clivagem redutiva da ligação azo é provavelmente a reação metabólica de maior importância toxicológica dos compostos azoicos (CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992).

É importante destacar que, devido aos trabalhos publicados com o tema “corantes”, fui convidada para escrever o capítulo intitulado “Azo dyes and their metabolites: Does the discharge of the azo dye into water bodies represent human and ecological risks?” no livro “Textile Dyeing / Book 2”, ISBN 979-953-307-032-1, editado pelo Prof. Dr. Peter Hauser, sendo que já obtive a resposta da aceitação do manuscrito para a publicação.

Considerando o exposto, neste trabalho foi avaliada a capacidade de ligação dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 com o DNA e a base nitrogenada guanósina, a fim de elucidar o mecanismo de ação mutagênica. Adicionalmente, foi realizada a análise do potencial mutagênico do corante Disperse Red 1 e de seus metabólitos por meio do teste de mutação gênica em células de linfomas de camundongo (*Mouse Lymphoma Assay*). Também foram avaliados os produtos de oxidação e redução dos azo corantes estudados, por meio do teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*.

1.3 Avaliação dos danos induzidos pelos corantes e por seus produtos de biotransformação ao material genético

Neste trabalho foram utilizadas três técnicas para avaliar a capacidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 e de seus produtos de biotransformação de se ligarem ao DNA: uma espectrofotométrica (que será explicado no item Material e Métodos) e duas biológicas, quais sejam, teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongo e ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, descritos a seguir.

Teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongo

Este ensaio foi realizado na Universitat Autònoma de Barcelona, na Espanha, sob a orientação do Prof. Dr. Ricard Marcos. O ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo ou *Mouse Lymphoma Assay* (MLA) é o mais amplamente utilizado dos vários ensaios *in vitro* de mutação gênica em células de mamíferos existentes (SORIANO; CREUS; MARCOS, 2007). Este ensaio foi originalmente desenvolvido por Clive e colaboradores em 1972, que utilizavam *soft agar* para clonar e contar as colônias mutantes (CLIVE et al., 1972).

O MLA quantifica alterações genéticas que afetam a expressão do gene TK da enzima timidina quinase (*Tk*) em células L5178Y TK^{+/-} de linfoma de camundongo (CLIVE et al., 1979). Essa linhagem celular é heterozigótica para o locus autossômico da timidina kinase, situado na parte distal do cromossomo 11 de camundongo. As células heterozigotas *Tk*^{+/-}, quando crescem em suspensão, mutam espontaneamente a *Tk*^{-/-} com uma frequência de 2×10^{-6} mutações/locus/geração. Enquanto que a frequência de reversão espontânea de *Tk*^{-/-} a *Tk*^{+/-} é 300 vezes inferior, 6×10^{-9} mutações/locus/geração, sendo considerada desprezível em um ensaio de genotoxicidade e sem repercussão importante nos resultados (CLIVE et al., 1979; TÁRRAGA, 2009). Ademais, na linhagem L5178Y os cromossomos 11 homólogos são essencialmente iguais, embora diferenciem entre si devido a um heteromorfismo centromérico. O cromossomo homólogo com centrômero mais curto é conhecido como 11a, enquanto que o de maior tamanho é chamado 11b (HOZIER et al., 1982; SAWYER et al., 1985; TÁRRAGA, 2009).

O espectro de detecção do ensaio abrange mutações gênicas (mutações de ponto) e eventos cromossômicos (deleções, translocações, recombinações mitóticas/ conversão gênica e aneuploidia) (LIMA, RIBEIRO, 2003). Tendo em vista a localização autossômica do gene *Tk*, este ensaio detecta não somente eventos intragenéticos, como também os pontos de mutação bem como a perda de heterozigosidade. Este fato pode resultar na perda do gene *Tk* inteiro, o que conduz às deleções cariotipicamente visíveis e rearranjos do transporte do cromossomo *Tk*⁺ (SORIANO; CREUS; MARCOS, 2007). Dessa maneira, essas características fazem com que esse ensaio com células de linfomas de camundongo seja particularmente útil para a avaliação da capacidade de substâncias químicas de induzir uma extensa variedade de eventos mutacionais (HARRINGTON-BROCK; COLLARD; CHEN, 2003).

O MLA, além de quantificar mutações gênicas no locus timidina quinase (*tk*), também tem sido amplamente usado, por muitos anos, para determinar o potencial genotóxico de substâncias químicas (CLEMENTS, 2000) e ainda em testes de mutagenicidade de curta duração (DOERR; HARRINGTON-BROCK; MOORE, 1989). Ademais, esse ensaio é útil para prever a clastogenicidade de um composto químico (HOZIER et al., 1985; DOERR; HARRINGTON-BROCK; MOORE, 1989). Por meio desse ensaio, também é possível determinar a proporção relativa de dois tipos de mutantes (colônias pequenas e largas): a indução de pequenas colônias

mutantes é associada a alterações cromossômicas no cromossomo 11, o qual contém o locus *tk*, enquanto que largas colônias de mutantes podem ser associadas a eventos de menor escala, talvez mutações em um único gene (HOZIER et al., 1985). O Instituto Nacional de Câncer utiliza dados desse teste para auxiliar na seleção de substâncias químicas para bioensaios crônicos e para apoiar atividades de pesquisa intramural (CAMERON et al., 1985, 1987).

Princípio do teste:

Como mencionado, o MLA utiliza células de linfoma de camundongos L5178Y ($TK^{+/-}$ linhagem clonal 3.7.2c.). Essas células contêm a enzima timidina quinase (*tk*) e são sensíveis aos efeitos citostáticos e citotóxicos de concentrações apropriadas de trifluorotimidina (TFT) (MOORE-BROWN et al., 1981). Assim, a metodologia fundamenta-se na perda de heterozigotidade do *locus* da enzima timidina quinase ($tk^{+/-} \rightarrow tk^{-/-}$) quando o gene é afetado por um agente mutagênico, ocasionando resistência das células mutadas ($TK^{-/-}$) à suplementação do meio com TFT (CLEMENTS, 2000). A TFT, análogo à timidina, causa inibição do metabolismo impedindo a divisão celular e levando à morte as células que possuem íntegra a via de recuperação de nucleosídeos (pelo menos um alelo TK^{+}) (LIMA, RIBEIRO, 2003). Portanto, mutações a um único gene TK funcional pode resultar na perda da atividade TK e, conseqüentemente, na aquisição de resistência à TFT. Estas células mutantes podem ser quantificadas após um período de expressão adequado pelo clone em meio agar suplementado com agente seletivo, a TFT (MOORE-BROWN et al., 1981).

Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O ensaio *Salmonella typhimurium*/microssoma, também conhecido como Teste *Salmonella* ou Teste de Ames, é um ensaio bacteriano de curta duração, amplamente aceito para identificação de substâncias que podem produzir dano genético, o qual conduz a mutações nos genes (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). É usado mundialmente como um ensaio inicial para determinar o potencial mutagênico de novas drogas e substâncias químicas porque há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (McCANN et al., 1975; ZEIGER et al., 1990; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Este ensaio está em uso há mais de 20 anos tendo em vista a sua alta sensibilidade e reconhecida validação (ASHBY; TENNANT, 1991; JARVIS et al., 1996; KAPLAN et al., 2004). Além disso, é recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) para proteção da saúde humana e do meio ambiente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004) e por comunidades científicas, agências e corporações governamentais (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Este teste utiliza um número de linhagens de *Salmonella* com mutações preexistentes que deixam a bactéria incapaz de sintetizar o aminoácido requerido, a histidina, e, portanto, incapaz de crescer e formar colônias na ausência do mesmo. Novas mutações no lugar destas mutações pré-existentes, ou próximas aos genes, podem restaurar a função dos genes e permitir que as células sintetizem histidina. Essas células novamente mutadas podem crescer na ausência de histina e formarem colônias. Por esta razão, o teste é freqüentemente referido como um “ensaio de reversão” (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Bactérias não têm o sistema de oxidação citocromo P450 usado pelos vertebrados em detoxificação metabólica de compostos exógenos. Como alguns dos metabólitos produzidos pelo citocromo P450 são mutagênicos, é importante mimetizar esse sistema nos ensaios com bactérias através da adição de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com Aroclor-1254 (mistura S9). Desse modo, os pró-mutágenos, ou seja, substâncias que exercem sua atividade mutagênica após metabolização, serão detectados pela adição de S9 e os mutágenos de ação direta, isto é, aqueles que não precisam ser metabolizados via citocromo P450 para exercerem seu efeito mutagênico serão identificados sem S9 (AMES; McCANN; YAMASAKI, 1975; MARON; AMES, 1983; JARVIS et al., 1996).

Este teste emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parenteral LT2, auxotróficas para histidina (*his⁻*), apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a sua capacidade de síntese. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada

(UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). As linhagens de *Salmonella* utilizadas neste teste são pertencentes ao grupo de Enterobactérias, que são capazes de produzir nitrorredutase e azorredutase (UMBUZEIRO et al., 2005b).

Além da mutação no *operon* da histidina, as linhagens apresentam características genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos tipos de agentes mutagênicos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

As enzimas acetiltransferase e nitrorredutase estão envolvidas na ativação metabólica intracelular de nitroarenos e aminas aromáticas em *Salmonella typhimurium*. O plasmídeo contendo ambos os genes da acetiltransferase e nitrorredutase foi introduzido nas *S. typhimurium* TA98 e TA100. As linhagens resultantes, YG1041 e YG1042, respectivamente, mostraram altos níveis de ambas atividades enzimáticas e são mais sensíveis à ação mutagênica de alguns compostos nitro-aromáticos (HAGIWARA et al., 1993).

O ensaio *Salmonella*/microsoma, apesar de ser um teste bacteriano, é uma ferramenta importante capaz de prever os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após a ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria com características metabólicas similares à flora intestinal de mamíferos (UMBUZEIRO et al., 2005b). Assim, neste trabalho foram escolhidas as linhagens TA98 e YG1041, baseado no trabalho de Ferraz (2008), para avaliação da mutagenicidade dos produtos.

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

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	<i>hisD3052</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , Δ <i>bio</i> ³ , Δ <i>uvrB</i> ⁴ , pKM101(Ap ^r) ⁵	Deslocamento do quadro de leitura	Maron; Ames, 1983; Umbuzeiro et al., 2005b
YG1041	<i>hisD3052</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , Δ <i>bio</i> ³ , Δ <i>uvrB</i> ⁴ , pKM101 (Apr) ⁵ , com alta produção de nitrorredutase e O-acetiltransferase (pYG233) (Cn ^r) ⁶	Deslocamento do quadro de leitura	Hagiwara et al., 1993; Umbuzeiro et al., 2005b

¹ *his* mutação responsável pela síntese da histidina

² *rfa* permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

³ dependência à biotina

⁴ Δ *uvrB* deleção do gene *uvrB*

⁵ Apr ampicilina resistent

⁶ Cnr canamicina resistente

Tendo em vista o que foi mostrado anteriormente, este trabalho teve como objetivo investigar e analisar os produtos obtidos após a biotransformação dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, cujas estruturas químicas estão mostradas na Figura 7.

Figura 7 - Estrutura química dos azo corantes selecionados como modelo: (A) Disperse Red 1, (B) Disperse Red 13, (C) Disperse Orange 1.

Os potenciais mutagênicos desses azo corantes foram estudados em diferentes parâmetros (CHEQUER, 2008, 2009; FERRAZ, 2008, 2010). Os estudos mostraram que os três compostos aumentaram a frequência de MNs tanto em linfócitos humanos como em células HepG2, em relação aos controles negativos. Para o teste de MNs em linfócitos humanos, a média do número de MNs induzidos em 1000 células binucleadas analisadas pelo corante Disperse Red 13 é maior em relação ao apresentado pelos corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1, o que indica ser este o corante com maior potencial mutagênico nas condições do ensaio. Já em células HepG2, os três corantes apresentaram potenciais mutagênicos semelhantes, visto que a média do número de MNs apresentada pelos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 foi semelhante (CHEQUER, 2008, 2009).

Adicionalmente, os potenciais mutagênicos destes mesmos corantes foram confirmados por meio do ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, utilizando as linhagens TA98, YG1041, TA100 e YG1042, na presença e ausência de ativação metabólica (mistura S9). Tal mutagenicidade foi significativamente mais

intensa com as linhagens TA98 e YG1041 o que mostra que o principal mecanismo de ação mutagênica apresentado pelos três corantes é o deslocamento do quadro de leitura do DNA, tipo de dano identificado por essas linhagens. Além disso, a potência com as linhagens superprodutoras de nitrorredutase 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 nitrorredução e acetilação na ativação destes compostos. Porém, foi observada uma redução da mutagenicidade dos três corantes após a adição do sistema de metabolização exógena (S9) (FERRAZ, 2008, 2010). Embora esses dados tenham mostrado que as reações de biotransformação são capazes de alterar a mutagenicidade dos corantes, há pouco conhecimento sobre a biotransformação dos azo corantes pelas bactérias intestinais humanas e de enzimas animais, as quais são capazes de degradar compostos (SEESURIYACHAN et al., 2007).

Dessa forma, neste trabalho foi realizada a investigação dos produtos oriundos dos processos de oxidação e redução dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1. Para tanto, inicialmente foram realizados ensaios eletroquímicos, simulando as condições endógenas de oxidação e redução dos corantes, e acompanhamento da modificação do grupo cromóforo (perda de cor) por meio de análises espectrofotométricas e por CLAE/DAD. Paralelamente, foram realizados ensaios semelhantes utilizando o sistema de oxidação microssomal S9 nas condições do ensaio *Salmonella*/microssoma, acompanhando os produtos da mesma forma citada acima. Propomos também a identificação das aminas aromáticas e de outros compostos gerados após a biotransformação desses corantes estudados empregando CLAE/DAD e CG/EM. E, conforme mencionado anteriormente, o potencial mutagênico desses produtos formados foi analisado por meio do ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo e do teste de Ames. Ainda, foi investigada a capacidade de ligação dos corantes originais com o DNA e a guanosina, a fim de elucidar o mecanismo de ação mutagênica desses compostos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve dois grandes objetivos gerais:

- 1- Avaliar a capacidade de dano ao material genético dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1;
- 2- Investigar a formação de produtos mutagênicos decorrentes da oxidação/redução dos corantes estudados.

Para atingir esses objetivos foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1- Avaliar a interação dos corantes com o DNA e com a base nitrogenada guanossina, acompanhados por análise espectrofotométrica;
- 2- Avaliar a mutagenicidade do corante Disperse Red 1 empregando o ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo;
- 3- Mimetizar a biotransformação endógena por oxidação e redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 utilizando os ensaios eletroquímicos;
- 4- Promover a reação de oxidação dos corantes por meio da reação com S9, nas condições do ensaio de *Salmonella*/microsoma;
- 5- Avaliar a mutagenicidade dos produtos gerados a partir dos ensaios eletroquímicos empregando-se o ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo e o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*.
- 6- Investigar a possível formação de aminas aromáticas após os ensaios eletroquímicos e reação com S9 por CLAE/DAD;
- 7- Identificar a estrutura química de outros compostos gerados por CG/EM;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Corantes estudados

Conforme já citado, neste trabalho estão sendo estudados os corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 (Figura 7).

Os corantes foram adquiridos pela empresa Sigma-Aldrich e possuem as seguintes características:

- Disperse Red 1
  - ✓ Sinonímia: N-etil-N(2-hidroxietil)-4-(4-nitrofenilazo)anilina
  - ✓ Fórmula molecular: $C_{16}H_{18}N_4O_3$
  - ✓ Pureza: 95%
  - ✓ Peso molecular: 314,34
  - ✓ CAS: 2872-52-8
- Disperse Red 13
  - ✓ Sinonímia: 2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino] etanol
  - ✓ Fórmula molecular: $ClC_6H_3(NO_2)N=NC_6H_4N(C_2H_5)CH_2CH_2OH$
  - ✓ Pureza: 95%
  - ✓ Peso molecular: 348,78
  - ✓ CAS: 3180-81-2
- Disperse Orange 1
  - ✓ Sinonímia: 4-(4—nitrofenilazo)difenilamina
  - ✓ Fórmula molecular: $O_2NC_6H_4N=NC_6H_4NHC_6H_5$
  - ✓ Pureza: 15%
  - ✓ Peso molecular: 318,33
  - ✓ CAS: 2581-69-3

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação dos danos ao material genético

Neste trabalho, a capacidade de indução de dano ao material genético dos corantes e dos seus produtos de biotransformação (obtidos segundo o item 3.2.2.3) foi avaliada de três formas:

- A. Reação dos corantes originais com o DNA e a base nitrogenada guanosina;
- B. Teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongo, utilizado para o corante original Disperse Red 1 e seus produtos de biotransformação (obtidos segundo o item 3.2.2.3);
- C. Avaliação da mutagenicidade dos produtos obtidos pela técnica de eletrólise a potencial controlado (item 3.2.2.3) utilizando o ensaio de *Salmonella*/microsoma;

3.2.1.1 Reação dos Corantes com o DNA e a Guanosina

Foi avaliada a capacidade dos corantes originais (Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1) de formar adutos com o DNA, especificamente com a base nitrogenada guanosina.

No caso da reação com o DNA, inicialmente foram preparadas duas soluções, uma a 1,5 mg/mL e outra a 4,0 mg/mL de DNA, como se segue:

Em um microtubo, foram pesados 3 mg de sal sódico de ácido desoxirribonucléico proveniente do timo de bezerro (Sigma) (DNA) e, em seguida, foram acrescentados 2 mL de água destilada, para o preparo da solução a 1,5 mg/mL. Para o preparo da solução a 4,0 mg/mL foram pesados 8 mg de DNA. Estas soluções foram mantidas por 24 horas a 4°C. A solução mais concentrada de DNA foi utilizada para aumentar a concentração de DNA na solução sem alterar a proporção de corante no volume final de 2 mL, o que prejudicaria a leitura espectrofotométrica.

Foram adicionados volumes diferentes das soluções de DNA a 1,5 e 4,0 mg/mL às soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L a fim de obter as seguintes concentrações finais de

DNA: 0,0075; 0,015; 0,0225; 0,0375; 0,075; 0,15; 0,225 e 0,3 mgDNA/mL, mantendo o volume final de 2 mL para cada frasco. Logo após a adição do DNA às soluções dos corantes, foi realizada a primeira leitura espectrofotométrica. Os espectros foram monitorados sob potenciais fixos e as mudanças dos espectros monitoradas simultaneamente no intervalo de 200 a 1200 nm no espectrofotômetro Hewlet Packard modelo 8453. Em seguida, as soluções foram guardadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após 4 horas, estas soluções foram submetidas a novas medidas espectrofotométricas nas mesmas condições especificadas.

Para as análises dos corantes com a base nitrogenada guanosina foram utilizadas as seguintes concentrações dos três corantes: $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L e $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L, dissolvidos em DMSO. A cada concentração dos corantes foi acrescida o dobro de guanosina 5' monofosfato de sódio hidratada, ou seja, $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L; $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L e $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L, respectivamente. A mistura da guanosina com a solução de cada corante foi mantida em ultrassom por 2 minutos. Os espectros foram monitorados sob potenciais fixos e as mudanças foram monitoradas simultaneamente no intervalo de 200 a 1200 nm no mesmo espectrofotômetro.

3.2.1.2 Ensaio de Mutação Gênica em Células de Linfoma de Camundongo

Este ensaio foi realizado na Universitat Autònoma de Barcelona, na Espanha, sob a orientação do Prof. Dr. Ricard Marcos, entre os meses de abril a setembro de 2010. Foi obtido o resultado completo deste teste para o corante Disperse Red 1 e seus produtos de oxidação e redução. Entretanto, não houve tempo hábil para fazer para os demais corantes, devido a um problema existente nas células L5178Y $tk^{+/-}$, que apresentaram alta frequência de mutação no controle negativo, portanto, vários testes foram invalidados. Foi feita a versão do ensaio em vários micropoços em concordância com as diretrizes atuais do OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*), segundo a metodologia descrita por Soriano, Creus e Marcos, 2007. As células de linfomas de camundongo L5178Y $tk^{+/-}$ foram gentilmente cedidas pelo Dr. Olivier Gillardeux (Sanofi-Synthélabo, Paris, France), e estas foram cultivadas para preparar as soluções celulares a serem estocadas, as quais foram mantidas em nitrogênio líquido com a densidade de 2×10^6 células/mL, em meio de

cultivo contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Estes cultivos celulares foram confirmados como livre de micoplasma pelo PCR.

As células foram cultivadas em suspensão em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro de cavalo inativado pelo calor, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1mM de piruvato de sódio e 2,5 µg/mL de anfotericina B. Durante o tratamento a concentração do soro foi reduzida para 5% e aumentada para 20%, quando as células foram dispensadas em micropoços. As culturas foram diariamente diluídas em 2×10^5 células/mL a fim de evitar o crescimento exagerado (maior que 10^6 células/mL). A densidade celular foi determinada utilizando o hemocítômetro.

Limpeza dos Excessos de Mutantes dos Cultivos Celulares (Purgação dos Cultivos Celulares)

Para preparar os estoques celulares utilizados nos experimentos de mutação gênica, os cultivos foram purgados para eliminar o excesso de mutantes $Tk^{-/-}$ através da cultura em meio THMG por 24 horas. Este meio contém Timidina (9 µg/mL), Hipoxantina (15 µg/mL), Metotrexato (0,3 µg/mL) e Glicina (22,5 µg/mL). Depois desse procedimento, as células foram transferidas para o meio THG (sem metotrexato) por 2 dias. As culturas purgadas foram verificadas quanto ao baixo nível basal de mutantes $Tk^{-/-}$ e estocadas em nitrogênio líquido.

Ensaio de Mutação Gênica

Experimentos preliminares foram feitos para determinar a solubilidade e a citotoxicidade dos compostos químicos a serem testados. A citotoxicidade foi determinada pelo crescimento total relativo (CTR) após 4, 24 e 48 horas em concentrações desde 0,1 até 500 µg/mL, sem ativação metabólica.

O cálculo do CTR leva em consideração a perda celular após o tratamento, a redução da taxa de crescimento durante o período de expressão e qualquer redução na eficiência de plaqueamento no dia de seleção dos mutantes (CLIVE; SPECTOR, 1975). A mais alta concentração estava com CTR de 20-40%, no entanto, não foi possível testar concentrações mais altas, porque nestas condições ocorria a precipitação da amostra ao ser colocada no meio contendo as células. Assim, foram

testadas as concentrações de 0,1 a 250 µg/mL, pois na concentração de 500 µg/mL ocorreu a precipitação.

Cada experimento consistiu de um controle negativo (solvente), um controle positivo (metil metano sulfonato a 10 µL/mL) e seis concentrações de cada composto a ser testado. Um total de 10^7 células para cada cultura foram cultivadas em meio R10 (com 10% de soro de cavalo) e colocadas em uma série de tubos de centrifuga estéreis. Solvente (DMSO), composto químico teste ou controle positivo foram adicionados. As células foram incubadas sob uma leve agitação (50 rpm) a 37°C por 4 horas. Após a exposição, as células foram lavadas e diluídas a 2×10^5 células/mL. As células foram transferidas para frascos de cultura, contadas diariamente e subcultivadas a 2×10^5 células/mL por um período de 2 dias para permitir a expressão de mutações induzidas (fenótipo *Tk*- deficiente). Então as células foram semeadas em duplicatas para cada cultura para calcular a viabilidade e a frequência de mutação (FM) sobre o segundo dia.

Os dados da contagem celular foram utilizados, em conjunto com os dados da viabilidade celular obtidos no segundo dia, para gerar os valores do CTR corrigidos para toxicidade pós-tratamento, os quais promovem uma indicação dessa toxicidade em comparação com os veículos controles. Os valores CTR foram utilizados para decidir sobre a aceitabilidade da toxicidade de cada concentração do corante Disperse Red 1 e de seus produtos formados após os processos de oxidação e redução.

Plaqueamento para determinação da Viabilidade

As culturas foram ajustadas a 1×10^4 células/mL. Uma porção de cada cultura foi removida e diluída a 10 células/mL. Cada cultura foi então dispensada em 0,2 mL/poço sobre placas contendo 96 poços (foram feitas 2 placas para o controle negativo, para cada substância química testada e para o controle positivo). As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante o período de 11 a 13 dias.

Plaqueamento para determinação da Resistência ao 5-Trifluorotimidina (TFT)

A TFT foi adicionado às culturas (1×10^4 células/mL) na concentração final de 4 µg/mL. Cada cultura tratada com TFT foi dispensada em 0,2 mL/poço sobre placas

contendo 96 poços (foram feitas 2 placas para o controle negativo, para cada substância química testada e para o controle positivo, seguindo o mesmo procedimento para a determinação da viabilidade). As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante o período de 11 a 13 dias. Após esse tempo de incubação, os poços que continham colônias foram marcados. Foi feita uma leitura visual das colônias utilizando um julgamento qualitativo. Para avaliar as placas de mutações contendo TFT, foi adicionada a cada poço a solução de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT, 2,5 mg/mL) e as placas foram incubadas por 4 horas para que as colônias celulares adquirissem coloração negra, conforme mostra a Figura 8. O tamanho da colônia foi estimado de maneira similar ao descrito por Honma et al., 1999:

- Colônia grande: possui tamanho maior que $\frac{1}{4}$ do diâmetro do poço, morfologia difusa em todo o poço ou somente na periferia;
- Colônia pequena: possui tamanho menor ou igual a $\frac{1}{4}$ do diâmetro do poço, morfologia compacta.

Figura 8 - Plaqueamento para determinação da resistência ao 5-Trifluorotimidina através da leitura visual das colônias grandes (A) e pequenas (B).

Análises Estatísticas

O Grupo de Trabalho do MLA durante o *International Workshop on Genotoxicity Tests* (IWGT) (MOORE et al., 2003) afirmou que a relevância biológica deveria ser o principal fator nos dados de avaliação. Portanto, é recomendada uma aproximação biologicamente relevante para avaliar os dados do MLA, a qual requer que a frequência de mutantes induzidas (FMI) exceda alguns valores baseados sobre a base global da frequência de mutantes (FM). Este valor é o fator de avaliação global (FAG), o qual é considerado 126 para a versão de micropoços. O FMI é obtido pela $FM - FME = FMI$, onde FM é uma das frequências de mutantes da cultura-teste e FME é a frequência de mutantes espontânea (ou seja, FM do controle negativo). A resposta de um agente testado em um experimento é positiva quando a FMI para qualquer tratamento coincide ou excede o FAG, e também quando um teste de tendência positiva é obtido. Por exemplo, se o controle negativo de um experimento de micropoços é 70×10^{-6} , então uma das culturas teste deve ter uma FM de pelo menos $70 + 126 \text{ (FAG)} = 196 \times 10^{-6}$ a fim de acionar a aplicação da estatística.

A aproximação estatística utilizada foi a ANOVA *one-way* seguida pelo teste de *Dunnett*, utilizado para avaliar a significância da diferença na FM entre o controle e as culturas tratadas. A dose-resposta foi também calculada através do ensaio para a tendência linear (MOORE et al., 2003 ; McCLAIN et al., 2006). O nível de significância estatística foi determinado em 5%.

Cálculos de sobrevivência, viabilidade, proliferação celular e frequência de mutantes

Os cálculos utilizados são baseados nos trabalhos de Clements, 2000 e Tárraga, 2009.

A formação de colônias nos micropoços se descreve pela distribuição de Poisson, assim a eficiência de plaqueamento/clonação (EP) ou a viabilidade se calculam utilizando o término zero da distribuição de Poisson $\{P(0)\}$.

$$P(0) = \frac{\text{Nº de micropoços negativos}}{\text{Nº total de micropoços da placa}}$$

$$V \% = \frac{-\ln P(0)}{\text{Nº de células/micropoço}} \times 100$$

No caso das placas de viabilidade, foram semeadas 2 células/micropoço. Assim:

$$V \% = \frac{-\ln P(0)}{2} \times 100$$

Para as placas com TFT o cálculo é similar, mas levando em conta que são semeadas 2×10^3 células/micropoço:

$$\text{Frequência de mutação (FM)} = -\ln P(0) / 2 \times 10^3$$

A frequência de mutação (FM) se expressa como mutantes/ 10^6 células viáveis e se calcula como:

$$\text{FM/sobreviventes: FM} / V\%$$

O crescimento total relativo (CTR) é a medida de citotoxicidade do composto testado. Para determiná-lo, primeiramente se calcula o crescimento em suspensão relativo (CSR), a partir do crescimento diário celular (CDC) durante os dois dias de expressão fenotípica.

$$\text{CSR} = [\text{CDC1} \times \text{CDC2 (tratamento)}] / [\text{CDC1} \times \text{CDC 2 (controle)}]$$

CDC é a estimativa de crescimento entre o dia 0 e o dia 1 (CDC1) ou entre os dias 1 e 2 (CDC2). Vale destacar que o valor obtido pela multiplicação (CDC1 x CDC2) também é conhecido como crescimento em suspensão (CS). Assim, o CTR é calculado como: $\text{CTR}\% = \text{CSR} \times \text{VR}\%$

Onde VR (viabilidade relativa) é calculada comparando a eficiência de clonação (viabilidade) do tratamento com a do controle.

Crítérios de Aceitação do Ensaio

Os critérios de aceitação do ensaio são requisitos que devem ser cumpridos para considerar válidos e confiáveis os resultados obtidos neste ensaio de genotoxicidade. Estas recomendações se fundamentam pela experiência e opiniões formadas em vários

laboratórios como consequência do uso recorrente desse ensaio. As diretrizes são discutidas em reuniões especializadas, conhecidas como Conferências Internacionais sobre Ensaio de Genotoxicidade (MOORE et al., 2003).

Os critérios seguidos foram aqueles padronizados pelo Laboratório de Genética da Universitat Autònoma de Barcelona, segundo Tárraga (2009), que serão descritos abaixo.

Para o sistema de multipoços, considerando o tratamento de 4 horas, o controle negativo deveria apresentar a FM entre $(50 \text{ a } 170) \times 10^{-6}$, pois os valores de FM inferiores a 50×10^{-6} poderiam indicar uma deficiente recuperação das colônias pequenas, enquanto que os valores superiores a 170×10^{-6} podem gerar um incremento na FM dos tratamentos, não como consequência da genotoxicidade do composto, mas devido a uma elevada taxa de mutação presente no cultivo basal. É importante destacar que os valores de viabilidade ou de eficiência de crescimento podem ser superiores a 100%, refletindo a existência de erros na contagem das células ou na diluição do cultivo. Na prática, são considerados aceitáveis valores que não superem a 130%. Por outro lado, os valores inferiores a 65% podem afetar a recuperação das colônias mutantes nas placas contendo TFT, influenciando o cálculo da FM (TÁRRAGA, 2009).

No controle positivo deve-se utilizar uma concentração do composto capaz de proporcionar um aumento significativo da FM, em relação à frequência de mutação espontânea. Ademais, pelo menos 40% da FM devem corresponder a colônias pequenas. Igualmente às concentrações dos tratamentos, a concentração utilizada como controle positivo não deve dar valores do CTR inferiores a 10-20%, já que os dados obtidos em condições de excessiva toxicidade (inferior a 10% de CTR) se excluem da avaliação (MOORE et al., 2006; TÁRRAGA, 2009).

Uma resposta positiva no ensaio MLA é aquela caracterizada por um aumento na frequência de mutação induzida (FMI) em comparação com o controle negativo, e, além disso, esse aumento deve ser estatisticamente significativo dose-dependente e reprodutível (MOORE; COLLARD; HARRINGTON-BROCK, 1999; LIMA; RIBEIRO, 2003; TÁRRAGA, 2009). Como mencionado, a FMI é a diferença entre a FM (frequência de mutação) e a FME (frequência de mutação espontânea). Assim, um composto será considerado mutagênico quando der resultados significativos ($p < 0,05$) nas análises estatísticas (comparação múltipla, dois a dois, que permite comparar um conjunto de tratamentos em relação a um controle) e na

regressão linear, com poder tal de determinar uma possível relação dose-resposta. Quando não se obtém significação em nenhum dos dois casos, se considera resultado negativo. Se somente alcançar significação em uma das ambas provas, o resultado será considerado ambíguo e dever-se-á repetir o experimento (SOFUNI et al., 1997; TÁRRAGA, 2009).

3.2.1.3 Ensaio *Salmonella*/microsoma

A obtenção dos produtos de biotransformação dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 será apresentada mais adiante, no item 3.2.2.3. A análise da mutagenicidade desses produtos foi feita por meio do teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, utilizando as linhagens TA98 e YG1041, que possuem alta produção das enzimas azoredutase e acetiltransferase. Essas foram escolhidas por terem apresentado maior sensibilidade na avaliação da mutagenicidade dos corantes originais (FERRAZ, 2008). Os resultados apresentados para os produtos de oxidação e redução no Teste de Ames foram mostrados apenas em ausência de ativação metabólica (S9), primeiro porque esses compostos já sofreram o processo de metabolização, e segundo porque esses produtos, na presença de S9, reagiram com o tetrafluorborato de tetrabutylamônio (TBABF₄), utilizado como eletrólito suporte durante as Eletrólises a Potencial Controlado, formando produtos extremamente tóxicos para a *Salmonella*, impossibilitando a análise por este teste (dados não mostrados).

Foi utilizado o protocolo de pré-incubação (MARON; AMES, 1983) onde 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. Após crescimento, as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste. Em tubos previamente esterilizados foram colocados 100 µL de cultura de cada linhagem (10⁹ 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. 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 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 realizado em triplicata.

O número de revertentes por placa foi contado manualmente. Os testes foram acompanhados da avaliação da viabilidade e da taxa de reversão espontânea das linhagens. Nos testes realizados na ausência de ativação metabólica foi utilizado o tampão fosfato. Após a pré-incubação e incorporação do agar de superfície, as placas Petri foram incubadas invertidas por 66 horas a 37 °C. Todos os testes foram acompanhados de controles positivos e negativos apropriados. O DMSO foi empregado como controle negativo e os controles positivos nos testes sem S9 foram: 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,05 µg/placa para TA98, 4-nitro-o-fenilene-diamina a 1,0 µg/placa para a linhagem YG1041. Importante salientar que todos os reagentes químicos empregados no desenvolvimento desse trabalho foram de grau de pureza cromatográfica.

Meios de cultura e soluções utilizados no Ensaio Salmonella/microsossoma

- Meio de Vogel Bonner (50 x):

Composto por 10 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 91,43 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 500 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 175 g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 1 litro de água destilada morna. Após autoclavação 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 D-biotina ($\text{MM} = 244,3 \text{ mol/L}^{-1}$) e 0,0078 g L-histidina ($\text{MM} = 155 \text{ mol/L}^{-1}$) 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 foi composto por 200 mL de solução de glicose 10%, 780 mL de solução de agar, 20 mL de meio Vogel Bonner (50 x) e 12 mL de solução de

biotina e histidina 0,5mM. 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, foi utilizado 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 1 L 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 1 L de agar mínimo em substituição à solução de biotina e histidina 0,5 mM.

- Solução de biotina 0,5 mM:

0,012 g 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:

403 mg 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 1 L 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 1 L 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 1 L 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 armazenada em refrigerador em frasco escuro.

- Solução de canamicina 8 mg/mL:

0,08 g de canamicina foram dissolvidos em 10 mL de água morna. A esterilização desta solução foi feita por membrana filtrante de 0,45 µm (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro.

- Solução de cristal violeta 0,1%:

0,1 g de cristal violeta foram dissolvidos em 100 mL de água destilada previamente esterilizada. Esta solução pode ser armazenada à temperatura ambiente por tempo indeterminado.

- Mistura S9 – 4% v/v:

Cada 100 mL de mistura S9 foi composta por 39,5 mL de água destilada estéril, 50 mL de tampão fosfato 0,2M, 4 mL de NADP, 0,5 mL de glicose-6-fosfato 1,0 mol/L, 2 mL da solução de sais (KCl 1,65 mol/L e MgCl₂ 0,4 mol/L) e 4 mL de fração S9, preparadas conforme descrito abaixo. Essa solução foi sempre 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:

Solução A

2,84 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Solução B

2,76 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O) 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 em autoclave o tampão foi estocado em frasco escuro na temperatura ambiente.

Solução de NADP 0,1 M:

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

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

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

- Água de diluição

Solução A (g/L):

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

Solução B (g/L):

81,1 g de cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) foram dissolvidos em 1 L 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 foi completado para 1,0 L 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) foram preparadas soluções-mãe de 1 mg/mL em DMSO e as mesmas foram diluídas para as concentrações adequadas.

Esterilização e Lavagem de vidraria

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

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

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 dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor. As culturas de uso rotineiro também foram mantidas em freezer a -70°C, em ampolas com 180 μ L de cultura e 20 μ L de DMSO.

As culturas de uso rotineiro foram preparadas a cada 6 meses e as características genéticas de cada linhagem foram previamente avaliadas como descrito abaixo a seguir:

100 μ L de cultura permanente foram inoculados em 20 mL de caldo nutriente com 25 μ g/mL de antibiótico (ampicilina para a linhagem TA 98 e canamicina para a linhagem YG1041) e, após 16 horas de incubação 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, 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 *zaragatoa* 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.

Avaliação das características genéticas das linhagens

As linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas nesse 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 Umbuzeiro e Vargas, 2003.

- Dependência de histidina

Inoculou-se a cultura crescida em caldo nutriente em placa de agar mínimo com biotina e, a seguir, em placa de agar mínimo com histidina e biotina. A dependência de histidina foi confirmada pelo crescimento das linhagens em placa de agar mínimo com histidina e biotina e ausência de crescimento na placa com agar mínimo com biotina.

- Mutação rfa

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

- Plasmídeo pKM101

Com o 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 não apresentaram crescimento sobre a linha de antibiótico.

- Plasmídeo pYG233

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

- 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 apresentaram esta mutação cresceram 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.

Interpretação dos resultados

Para todos os protocolos, o número de revertentes no controle negativo é a taxa de reversão espontânea obtidas nas condições do ensaio. Ao se tratar essa mesma cultura com doses crescentes de um agente ou mistura de compostos com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao número das doses de exposição, até um platô, aonde as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA ou, pela ação de outros compostos tóxicos presentes na amostra. Espera-se, portanto, uma relação dose-resposta entre o número de revertentes por placa e as doses de uma amostra com atividade mutagênica.

A análise de variância (ANOVA) é aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre o controle negativo e as doses aplicadas, seguida de regressão

linear. A potência da amostra é expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. São várias as formas de expressão dos resultados, porém, a inclinação da reta é sempre proporcional à potência da amostra. Em geral, diferenças significativas entre doses testadas e o controle negativo, e relação dose-resposta comprovadas estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra. Entretanto cada ensaio tem seu critério específico, normalmente baseado na sua reprodutibilidade e características intrínsecas das linhagens teste (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

O cálculo da potência mutagênica dos produtos de biotransformação dos corantes no presente estudo foi obtido pelo software *Salanal*, um programa desenvolvido pelo *Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, N.C. USA* para análise estatística do ensaio *Salmonella*/microsossoma, usando o modelo de *Bernstein*, que utiliza tanto a ANOVA quanto a regressão linear (BERNSTEIN et al., 1982; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

3.2.2 Investigação das vias metabólicas dos corantes

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

As vias metabólicas dos corantes estudados neste trabalho foram investigadas utilizando reações de oxidação e redução. As reações de oxidação foram avaliadas por meio de três técnicas diferentes: uma técnica enzimática (reação com a mistura S9) e duas técnicas químicas (espectroeletroquímica e eletrólise a potencial controlado). Já as reações de redução foram realizadas apenas pelas duas técnicas químicas utilizadas na oxidação.

Para este conjunto de análises, inicialmente foi realizado um experimento piloto, a fim de determinar as melhores condições de trabalho. Para tanto, foi feito um perfil espectrofotométrico dos três corantes em diferentes concentrações ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L; $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) dissolvidos em DMSO, com o objetivo de escolher a melhor concentração para as investigações metabólicas.

3.2.2.1 Oxidação pelo sistema de metabolização microsomal de fígado de rato (mistura S9)

O sistema de metabolização S9 é largamente utilizado em ensaios de mutagenicidade (principalmente o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella/microsoma*) com o objetivo de mimetizar as reações de oxidação via citocromo P450. Estas reações são de extrema importância em Toxicologia, pois podem gerar produtos mais ou menos tóxicos, ou seja, bioativação e destoxificação, respectivamente.

Como já citado no item Introdução, em trabalhos anteriores realizados por Ferraz (2008, 2010), foi verificado que os corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 são mutagênicos no ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*. Porém, quando o ensaio foi realizado na presença de S9, este efeito foi reduzido. Por este motivo, neste trabalho foi realizada a reação dos três corantes com a mistura S9, acompanhados espectrofotometricamente, visando monitorar o efeito da reação via citocromo P450 no grupamento cromóforo dos corantes.

Preparo da mistura S9 – 4%v/v:

O preparo da mistura S9 foi realizado seguindo o protocolo estabelecido para o ensaio de mutagenicidade de *Salmonella* (MARON; AMES, 1983). 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 MgCl₂ 0,4 M) e 4 mL de fração S9, preparadas conforme descrito no item 3.2.1.3. Essa solução sempre foi preparada assepticamente, em banho de gelo, seguindo a ordem dada na adição dos reagentes. Essa solução é válida por 3 horas, sendo então descartada após esse tempo.

Como será demonstrado no item Resultados, a melhor concentração de trabalho dos corantes foi de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Uma vez fixada esta concentração, as proporções de S9 foram variadas (50 a 500 µL), a fim de escolher a quantidade ideal de S9 para metabolizar *in vitro* os corantes em análise. As soluções de cada corante ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) foram incubadas com os volumes variados de S9 por 90 minutos a 37°C. Devido à precipitação das proteínas da fração S9, ocorreu interferência na leitura espectrofotométrica. Sendo assim, decidiu-se extrair o produto da reação entre os corantes e o S9, utilizando diclorometano. Para isso foram colocadas 3

alíquotas de 3 mL de diclorometano, agitando logo em seguida. Após a total secagem de cada extrato à temperatura ambiente, foi colocado metanol para ressuspendê-lo e, então, foram feitas as análises.

As análises dos produtos formados a partir das reações com o S9 foram acompanhadas por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) (Shimadzu SCL-10AVR e HP 8453, respectivamente) e as medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Hewlett Packard modelo 8453.

As condições do CLAE/DAD foram: fase móvel acetonitrila: água (80:20 v/v), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 µL, temperatura ambiente para a coluna de separação G-ODS (C18) Varian (4 mm x 250 mm, 5 µm).

3.2.2.2 Oxidação e redução espectroeletroquímica dos corantes

A técnica de espectrofotometria Ultravioleta-Visível tanto para oxidação (potencial +1,5 V) como para redução (-1,5 V) tem sido utilizada com sucesso pelo grupo da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni com o intuito de mimetizar as reações endógenas no grupamento azo dos corantes.

As soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) contendo tetrafluorborato de tetrabutilamônio (TBABF₄) a 0,1 mol/L como eletrólito suporte. Após uma etapa de remoção de oxigênio, borbulhando nitrogênio (99,7% de pureza) durante 10 minutos, foram feitas as análises do processo de redução dos corantes.

A célula espectrofotoeletroquímica foi montada em uma cubeta de quartzo, onde foi introduzido um fio de ouro como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência conectado ao sistema através de um capilar de *Luigin*, onde todo o sistema foi conectado a um potenciostato e a um espectrofotômetro de arranjo de diodos HP 8453 interligado a um microcomputador HP Kayak. Os espectros foram monitorados em função da oxidação ou redução dos corantes sob potenciais fixos e as mudanças dos espectros monitoradas simultaneamente no intervalo de 200 a 1200 nm no espectrofotômetro. As reações foram monitoradas por meio de leituras a cada 10 minutos até o tempo máximo estipulado para cada corante, como será mostrado no item Resultados.

3.2.2.3 Eletrólise a Potencial Controlado

Para investigar as vias metabólicas dos corantes foi utilizada também outra técnica, a Eletrólise a Potencial Controlado. Nesta técnica é possível utilizar concentrações mais altas dos corantes e em maiores volumes (25 mL). Esse fato é interessante, pois além de avaliar o potencial eletroquímico dos corantes, os produtos de reação ainda puderam ser utilizados na análise por CLAE/DAD e por CG/EM, visando identificar possíveis aminas aromáticas e outros compostos formados. Ademais, estes produtos foram utilizados no ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo e no teste de mutagenicidade com *Salmonella*, descritos nos itens 3.2.1.2 e 3.2.1.3, respectivamente. Para tanto, foi realizada a monitorização das mudanças espectrais durante a redução e a oxidação desses corantes em meio não aquoso, visando obter informações sobre a formação de espécies radicalares. Assim, soluções estoque dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13, e Disperse Orange 1, em concentração de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L e 6×10^{-3} mol/L, foram preparadas pela dissolução direta dos corantes em DMSO/TBABF₄ a 0,01 mol/L (eletrólito de suporte). As medidas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB 71355 - ECO CHEMIE e um microcomputador IBM-286. Além disso, as reações por eletrólise foram monitoradas por CLAE/DAD, utilizando o método padronizado por Osugi et al. (2009). O equipamento utilizado foi um Shimadzu modelo SCL-10AVP com injeção automática. A coluna de separação utilizada foi G-ODS (C18) Varian (4 mm x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel foi acetonitrila: água (80:20 v/v) com vazão de 1 mL/min, em temperatura ambiente. Em todas as análises cromatográficas, as amostras foram previamente filtradas em filtros de PTFE (Politetrafluoretileno) de 0,45 µm.

No ensaio de redução eletroquímica, as soluções foram previamente submetidas à desaeração por 10 minutos através do borbulhamento de N₂ (99,7% de pureza).

3.2.3 Identificação dos produtos formados

No item Introdução foi relatado que as aminas aromáticas são os produtos de metabolização dos corantes de maior interesse toxicológico. Por este motivo, os produtos das reações obtidos ao final da técnica de Eletrólise a Potencial Controlado

foram analisados por CLAE/DAD, utilizando o método padronizado e validado por Lizier (2009). Esta etapa também foi realizada com a colaboração da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni e do doutorando Thiago Mescoloto Lizier, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

Novamente foi utilizado o Shimadzu modelo SCL-10AVP com injeção automática, nas seguintes condições: fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ =230 nm e volume injetado=20 μ L. A separação dos componentes foi efetuada utilizando-se uma coluna Shimadzu CLC-ODS (C18) com 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e sílica com diâmetro de 5 μ m com porosidade de 100 Å. Utilizou-se nas medidas uma pré-coluna do mesmo material, de 1,0 cm de comprimento, acoplada à mesma com o intuito de proteger a coluna principal de impurezas e partículas. Todas as amostras foram filtradas, antes de cada injeção com o auxílio de uma seringa em filtros MILLEX Millipore (0,45 μ m).

As aminas aromáticas e outros compostos identificados por CLAE/DAD foram confirmados por cromatografia em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM) com a colaboração do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, da Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi e do doutorando Rafael de Felício, ambos do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Essas análises foram efetuadas em CG/EM da marca Shimadzu modelo QP2010. O volume de injeção foi de 1,0 μ L e uma coluna DB-5 MS, a temperatura de injeção foi de 220 °C com split da amostra na taxa de 1:5, o fluxo na coluna de 1,0 mL/min e velocidade linear de 36,8 cm/seg. A temperatura inicial do forno foi de 80 °C, e estava programada para aumentar 15 °C/min até atingir 290 °C. A temperatura foi mantida em 290 °C por 30 min, com tempo total de análise de 45 min. As condições do detector de massa foram: temperatura da fonte de ionização de 250 °C, temperatura da interface de 280 °C, sem ganho de detector, com corte no tempo de aquisição para saída do solvente de 3,5 min. A aquisição de sinal foi no modo *scan* de m/z 50 a m/z 500. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação do espectro obtido com os bancos de dados da biblioteca *Wiley 7* e da biblioteca pessoal do laboratório de Química Orgânica da FCFRP/USP.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da capacidade de dano ao material genético dos corantes originais e de seus produtos obtidos após os processos de oxidação e redução

4.1.1 Reação dos corantes originais com o DNA e com a base nitrogenada guanossina

Inicialmente foi avaliada a capacidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 de interagir com o DNA visto que os potenciais mutagênicos desses três corantes foram comprovados na literatura (CHEQUER, 2008, 2009; FERRAZ, 2008, 2010).

Foram adicionados volumes diferentes das soluções de DNA às soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1. Nenhum dos três corantes reagiu com o DNA imediatamente. Assim, as soluções dos corantes em contato com o DNA foram armazenadas por 4 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Novamente foi feita a leitura espectrofotométrica. Os três corantes estudados começaram a interagir com o DNA a partir da concentração a 0,15 mgDNA/mL, conforme mostram as Figuras 10, 11 e 12, respectivamente.

A Figura 9 mostra que o comprimento de onda correspondente ao DNA é 270 nm, a absorbância é dose dependente até a concentração de 0,225 mgDNA/mL, pois ao adicionar a maior concentração do DNA (0,3 mgDNA/mL) o valor da mesma foi negativo.

Nos três corantes, a variação da absorbância no comprimento de onda de 270 nm corresponde à adição do DNA, no entanto ao adicionar 0,3 mgDNA/mL o pico correspondente ao aumento da quantidade de DNA sofre um deslocamento. Portanto, a partir da análise das Figuras 10, 11 e 12, percebe-se que após a adição da mais alta concentração de DNA (linha azul) ocorre uma alteração do pico do corante original (linha preta) no $\lambda = 300$ nm, o que pode indicar a ligação desta parte do corante com o DNA. Deve-se observar também que ao aumentar a concentração do DNA, ocorre uma redução da banda correspondente ao grupo azo, o que pode demonstrar a interação do DNA com esse grupo.

Figura 9 - Espectro das variadas concentrações do DNA em DMSO, sendo que a cor preta corresponde ao branco (DMSO puro); vermelha: 0,0075; verde: 0,015; azul escura: 0,0225; azul clara: 0,0375; lilás: 0,075; amarela: 0,15; verde musgo: 0,225 e roxa: 0,3 mgDNA/mL.

Figura 10 - Espectro do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (linha preta) em DMSO mais adição de 0,15 mgDNA/mL (linha vermelha), 0,225 mgDNA/mL (linha verde) e 0,3 mgDNA/mL (linha azul).

Figura 11 - Espectro do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (linha preta) em DMSO mais adição de 0,15 mgDNA/mL (linha vermelha), 0,225 mgDNA/mL (linha verde) e 0,3 mgDNA/mL (linha azul).

Figura 12 - Espectro do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (linha preta) em DMSO mais adição de 0,15 mgDNA/mL (linha vermelha), 0,225 mgDNA/mL (linha verde) e 0,3 mgDNA/mL (linha azul).

Os comportamentos espectroeletroquímicos dos azo corantes estudados foram também avaliados na ausência e na presença do nucleosídeo guanosina, como modelo de base nitrogenada do DNA, com o objetivo de verificar se algum desses corantes estudados teriam a capacidade de se ligar especificamente a essa base.

O grupamento cromóforo de nenhum dos três corantes estudados foi capaz de interagir com a guanosina, tendo em vista que não foram observadas alterações nos espectros de absorbância, mesmo com volumes crescentes desta base nitrogenada. As Figuras 13, 14 e 15 mostram que o espectro de absorção do grupo azo dos três corantes não se alterou, mesmo na maior concentração de guanosina. Nos três casos, a variação da absorbância no comprimento de onda de 262 nm corresponde à adição da guanosina.

Figura 13 - Espectro do corante Disperse Red 1 a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (linha preta) em DMSO mais adição de $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L de guanosina (linha vermelha).

Figura 14 - Espectro do corante Disperse Red 13 a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (linha preta) em DMSO mais adição de $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L de guanósina (linha vermelha).

Figura 15 - Espectro do corante Disperse Orange 1 a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (linha preta) em DMSO mais adição de $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L de guanósina (linha vermelha).

4.1.2 Avaliação da mutagenicidade do Corante Disperse Red 1 e de seus produtos de oxidação e redução utilizando o Ensaio de Mutação Gênica em Células de Linfoma de Camundongo (*Mouse Lymphoma Assay*)

Como mencionado no item Material e Métodos, tem-se os resultados deste teste somente para o corante Disperse Red 1 e seus produtos de oxidação e redução.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos após o tratamento das células de linfomas de camundongo com as seis concentrações selecionadas do corante Disperse Red 1. Estas concentrações do composto foram testadas em dois experimentos independentes e uma boa concordância foi observada entre os mesmos.

Tabela 2 - Toxicidade e mutagenicidade em células de linfomas de camundongo após tratamento com o corante Disperse Red 1. Esses resultados representam a média de 2 experimentos independentes.

Concentração (µg/mL)	Porcentagem da Eficiência de Plaqueamento	Frequência de Mutantes ($\times 10^{-6}$)	Crescimento Total Relativo (CTR)	FM(P/G) ^a	FMI (FM - FME)
Disperse Red 1 puro					
0	72	154	100	108/46	-
0,1	89	126	120	97/29	-28
1	82	165	113	125/40	11
10	70	164	81	103/61	10
50	76	140	76	97/43	-14
100	80	161	84	116/45	7
250	71	150	31	110/40	-4
MMS (10 µg/mL)	48	789*	61	652/137	635

^a Frequência de mutantes total dividida em frequência de mutantes das colônias pequenas/grandes (P/G)

* $P \leq 0,05$ (significativamente diferente do controle negativo)

Como visto no item Material e Métodos, a resposta de um agente testado em um experimento é positiva quando a FMI para qualquer tratamento coincide ou excede o FAG (Fator de Avaliação Global), e também quando um teste de tendência positiva é obtido. Portanto, nesse caso, como o controle negativo é 154×10^{-6} , então uma das culturas teste deveria ter uma FM de pelo menos $154 + 126$ (FAG) = $280 \times$

10^{-6} a fim de acionar a aplicação da estatística. Mas o valor máximo da FM obtido foi de 165×10^{-6} , o que confirma que os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos.

A Figura 16 mostra claramente que o corante Disperse Red 1 apresentou resposta negativa quanto à mutagenicidade para o MLA. Este gráfico foi construído a partir da média da frequência de mutantes encontradas nos dois experimentos independentes.

Figura 16 - Mutagenicidade do corante Disperse Red 1 sobre as células L5178Y/Tk^{+/+} de linfoma de camundongo.

O mesmo procedimento foi realizado para os produtos resultantes da oxidação do corante Disperse Red 1. E os resultados obtidos também foram semelhantes: nenhuma concentração analisada apresentou frequência de mutantes (FM) maior que a soma de 96 (FM do controle negativo) + 126 (FAG) = 222×10^{-6} , conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Toxicidade e mutagenicidade em células de linfomas de camundongo após tratamento com os produtos resultantes da oxidação do corante Disperse Red 1. Esses resultados representam a média de 2 experimentos independentes.

Concentração (µg/mL)	Porcentagem da Eficiência de Plaqueamento	Frequência de Mutantes ($\times 10^{-6}$)	Crescimento Total Relativo (CTR)	FM(P/G) ^a	FMI (FM - FME)
Disperse Red 1 oxidado					
0	90	96	100	71/25	-
0,1	85	215	87	166/49	119
1	76	182	82	121/61	86
10	73	216	73	158/58	120
50	76	169	74	123/46	73
100	82	166	56	106/60	70
250	81	196	40	181/15	100
MMS (10 µg/mL)					
	42	998*	36	871/127	902

^a Frequência de Mutantes Total dividida em frequência de mutantes das colônias pequenas/grandes (P/G)

* $P \leq 0,05$ (significativamente diferente do controle negativo)

Figura 17 - Mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 1 sobre as células L5178Y/Tk^{+/-} de linfoma de camundongo.

Em relação aos produtos de redução do corante Disperse Red 1, por meio dos valores de CTR foi observada uma maior toxicidade em comparação ao corante original e aos seus produtos de oxidação. Assim foram feitos experimentos preliminares com as seguintes concentrações desse composto: 0, 0,1, 1, 10, 50, 100, 150, 175, 200 e 250 µg/mL, mas as concentrações de 175, 200 e 250 µg/mL apresentaram valores do CTR inferiores a 20%, sendo, portanto, desconsideradas. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos após o tratamento das células com os produtos de redução do corante Disperse Red 1. Semelhante aos resultados do Corante Disperse Red 1 original e seus produtos de oxidação, os compostos resultantes da redução desse azo corante também não apresentaram frequência de mutantes (FM) maior que a soma de 149 (FM do controle negativo) + 126 (FAG) = 275×10^{-6} , conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Toxicidade e mutagenicidade em células de linfomas de camundongo após tratamento com os produtos resultantes da redução do corante Disperse Red 1. Esses resultados representam a média de 2 experimentos independentes.

Concentração (µg/mL)	Porcentagem da Eficiência de Plaqueamento	Frequência de Mutantes ($\times 10^{-6}$)	Crescimento Total Relativo (CTR)	FM(P/G) ^a	FMI (FM - FME)
Disperse Red 1 reduzido					
0	85	149	100	124/25	-
0,1	85	121	97	83/38	-28
1	75	201	87	147/54	52
10	98	130	82,5	105/25	-19
50	79	158	68,5	134/24	9
100	78	186	49,5	159/27	37
150	75	253	32,5	208/45	104
MMS (10 µg/mL)	54	749*	56,5	681/68	600

^a Frequência de Mutantes Total dividida em frequência de mutantes das colônias pequenas/grandes (P/G)

* $P \leq 0,05$ (significativamente diferente do controle negativo)

Figura 18 - Mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Red 1 sobre as células L5178Y/Tk^{+/-} de linfoma de camundongo.

Ao analisar as Figuras 16, 17 e 18 e as Tabelas 2, 3 e 4 pode-se perceber que tanto o corante Disperse Red 1 como os seus produtos de biotransformação apresentaram resultados negativos quanto à mutagenicidade para o MLA.

4.1.3 Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação e redução utilizando o Ensaio *Salmonella*/microsoma

Como mencionado no item Material e Métodos, a análise da mutagenicidade dos produtos formados após a oxidação e redução eletroquímica dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 foi feita utilizando o teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*. Este foi executado com as linhagens TA98 e YG1041, que possuem alta produção das enzimas azorredutase e acetiltransferase. Essas foram escolhidas por terem apresentado maior sensibilidade na avaliação da mutagenicidade dos corantes originais (FERRAZ, 2008, 2010). Os resultados apresentados para os produtos de biotransformação serão mostrados

apenas em ausência de ativação metabólica (S9), devido ao fato de que esses produtos já sofreram o processo de metabolização química, e também porque os mesmos reagiram com o tetrafluorborato de tetrabutilamônio (TBABF₄) a 0,01 mol/L, utilizado como eletrólito suporte durante as eletrólises a potencial controlado, formando compostos extremamente tóxicos para a *Salmonella* (dados não mostrados).

Análise da mutagenicidade dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Red 1 com as linhagens TA98 e YG1041 sem S9

Os produtos de oxidação do corante Disperse Red 1 apresentaram resposta mutagênica para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência de S9 (Figura 19 A e B). Analisando essa figura também é possível observar que a potência mutagênica deste corante oxidado com a linhagem YG1041 (184,30 rev/μg) é cerca de 5 vezes maior do que com a linhagem TA98 (35 rev/μg), o que mostra a importância da nitrorredução e acetilação na mutagenicidade destes produtos, visto que esta linhagem produz grande quantidade de nitrorredutase e acetiltransferase.

Figura 19 - Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 1 com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B). Os números entre parênteses foram gerados como valores da inclinação da reta, de acordo com o modelo de Bernstein et al. (1982), e representam a potência do composto.

A Figura 20 mostra o gráfico gerado a partir do ensaio dos produtos resultantes da redução desse corante com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B) na ausência de S9. Os resultados apresentados pelos produtos de oxidação e redução foram semelhantes, no entanto os potenciais mutagênicos apresentados pelos produtos de oxidação nas duas linhagens testadas foram maiores do que aqueles obtidos pelos produtos reduzidos. Essa observação pode ser visualizada na Figura 21. E também pode-se perceber que os potenciais mutagênicos no ensaio com a linhagem YG1041 foram menores para os produtos oxidados e reduzidos em relação ao corante original, enquanto que para a linhagem TA98 ocorreu efeito contrário. Os dados do corante Disperse Red 1 original foram obtidos pelo trabalho apresentado por Ferraz, 2008.

Figura 20 - Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Red 1 com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B). Os números entre parênteses foram gerados como valores da inclinação da reta, de acordo com o modelo de Bernstein et al. (1982), e representam a potência do composto.

Figura 21 - Comparação dos resultados obtidos pelo corante Disperse Red 1 original (FERRAZ, 2008), oxidado e reduzido.

Análise da mutagenicidade dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Red 13 com as linhagens TA98 e YG1041 sem S9

Assim como feito com o corante Disperse Red 1, foi realizado um ensaio para os produtos resultantes da oxidação e da redução do corante Disperse Red 13 com doses escolhidas em função do teste feito com esse corante original (FERRAZ, 2008), a fim de determinar a potência mutagênica dos seus metabólitos. Analisando a Figura 22, observa-se que com a linhagem YG1041 os produtos de oxidação desse corante apresentaram uma potência (11,70 rev/μg) 12 vezes maior do que com a linhagem TA98 (0,95 rev/μg), o que mostra a importância da nitrorredução e da acetilação na mutagenicidade desses produtos. Enquanto que observando a Figura 23, percebe-se que o mesmo fato ocorre com os produtos de redução, inclusive a relação entre os valores dos potenciais mutagênicos obtidos pelas linhagens YG1041 e a TA98 foi muito semelhante (11 vezes maior para a linhagem YG1041).

Figura 22 - Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 13 com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B). Os números entre parênteses foram gerados como valores da inclinação da reta, de acordo com o modelo de Bernstein et al. (1982), e representam a potência do composto.

Figura 23 - Comparação do perfil de mutagenicidade dos Produtos de Redução do corante Disperse Red 13 com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B). Os números entre parênteses foram gerados como valores da inclinação da reta, de acordo com o modelo de Bernstein et al. (1982), e representam a potência do composto.

Além disso, foi notada uma diminuição do potencial mutagênico dos produtos oxidados e reduzidos quando comparado com o corante original (FERRAZ, 2008) no ensaio feito com a linhagem YG1041, no entanto, da mesma maneira que foi observado para os produtos do corante Disperse Red 1, esses também mostraram aumento do potencial mutagênico quando testados com a TA98 (Figura 24).

Figura 24 - Comparação dos resultados obtidos pelo corante Disperse Red 13 original (FERRAZ, 2008), oxidado e reduzido.

Análise da mutagenicidade dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Orange 1 com as linhagens TA98 e YG1041 sem S9

O mesmo procedimento foi realizado para o corante Disperse Orange 1. O ensaio, com o intervalo de doses escolhidas de acordo com o estudo do corante original feito por Ferraz (2008), mostrou que tanto os produtos oxidados como os reduzidos do corante Disperse Orange 1 foram mutagênicos para as linhagens TA98 e YG1041 na ausência de S9 como ilustra as Figuras 25 e 26. Assim como os demais corantes estudados anteriormente, os produtos de oxidação e redução apresentaram potenciais mutagênicos maiores no ensaio feito com a linhagem YG1041, sendo que os produtos resultantes do processo oxidativo apresentaram potencial mutagênico com esta linhagem 67 vezes maior do que a TA98 (Figura 25), enquanto que os produtos reduzidos essa diferença foi de apenas 21 vezes maior para a linhagem YG1041, como mostra a Figura 26.

Figura 25 - Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Orange 1, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B). 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.

Figura 26 - Comparação do perfil de mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Orange 1, com as linhagens TA98 (A) e YG1041 (B). 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.

Analisando a Figura 27, percebe-se que os três corantes estudados apresentaram o mesmo perfil: diminuição do potencial mutagênico dos produtos oxidados e reduzidos quando comparados com o corante original (FERRAZ, 2008) para a linhagem YG1041, enquanto que para a TA98 foi observada uma elevação nesse potencial.

Figura 27 - Comparação dos resultados obtidos pelo corante Disperse Orange 1 original (FERRAZ, 2008), oxidado e reduzido.

A Tabela 5 mostra um resumo de todos os potenciais mutagênicos obtidos nos ensaios com as linhagens TA98 e YG1041 dos produtos de oxidação e de redução dos três corantes estudados.

Tabela 5 - Resultados de mutagenicidade dos produtos de oxidação e redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 para as linhagens TA98 e YG1041, na ausência de ativação metabólica (S9) em número de revertentes por micrograma.

Corantes	TA98		YG1041	
	Oxidado	Reduzido	Oxidado	Reduzido
Disperse Red 1	35.00	13.80	184.30	107,30
Disperse Red 13	0.95	0.60	11.70	6.60
Disperse Orange 1	1.40	0.80	94.00	17.00

Analisando a potência dos produtos de oxidação e de redução, observa-se que os produtos resultantes do corante Disperse Red 1 são os mais mutagênicos de todos, sendo que os produtos oxidados apresentaram 35 rev/ μ g e 184.30 rev/ μ g e os produtos reduzidos, 13.80 rev/ μ g e 107.30 rev/ μ g, para as linhagens TA98 e YG1041, respectivamente. Em seguida, vem os produtos oriundos do corante Disperse Orange 1, e por último, com menor potencial mutagênico, tem-se os metabólitos do Disperse Red 13, conforme mostra a Tabela 5. Os dados brutos dos experimentos com os produtos de oxidação e redução dos três corantes estudados encontram-se nos Apêndices A e B.

As Tabelas 6 e 7 mostram a viabilidade das linhagens TA98 e YG1041 utilizadas nos dois experimentos. Os valores apresentados estão de acordo com Mortelmans and Zeiger (2000) que estabeleceu que a viabilidade deve estar dentro de $1 - 2 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia/mL.

Tabela 6 - Viabilidade das linhagens no experimento feito com os produtos de oxidação dos três corantes estudados

Linhagem	Placa 1	Placa 2	Média	Resultado	D.P.
TA98	162	160	161	$1,61 \times 10^9$	1,41
YG1041	189	256	222,5	$2,23 \times 10^9$	47,4

Tabela 7 - Viabilidade das linhagens no experimento feito com os produtos de redução dos três corantes estudados

Linhagem	Placa 1	Placa 2	Média	Resultado	D.P.
TA98	98	101	99,5	$1,00 \times 10^9$	2,12
YG1041	111	101	106	$1,06 \times 10^9$	7,07

4.2 Perfil espectrofotométrico dos corantes originais

Conforme já citado no item Material e Métodos, inicialmente foi realizado um experimento piloto, a fim de determinar as melhores condições de trabalho para as análises espectrofotométricas. Para tanto, foi realizado um perfil espectrofotométrico

dos três corantes em diferentes concentrações ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L; $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) dissolvidos em DMSO. As Figuras 28 a 30 mostram o perfil dos três corantes.

Pela análise da Figura 28, observa-se que o Disperse Red 1 apresenta duas bandas características: uma em 288 nm e outra em 510 nm. No entanto, para as análises que devem ser realizadas, a banda que mais interessa é a próxima de 510 nm, pois esta corresponde ao grupo cromóforo, ou seja, à parte da molécula responsável pela cor do corante.

Figura 28 - Espectro do corante Disperse Red 1 solubilizado em DMSO nas seguintes concentrações: $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (cor preta); $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L (cor vermelha); $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (cor verde) e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (cor azul).

O corante Disperse Red 13 também apresenta uma banda por volta de 280 nm (284 nm), porém, a banda característica do grupo cromóforo aparece no comprimento de onda 530 nm (Figura 29).

Figura 29 - Espectro do corante Disperse Red 13 solubilizado em DMSO nas seguintes concentrações: $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (cor preta); $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L (cor vermelha); $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (cor verde) e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (cor azul).

A banda do grupo cromóforo do corante Disperse Orange 1 aparece no comprimento de onda 490 nm. Da mesma forma que os outros corantes analisados, este também possui a banda característica em 280 nm, porém apresenta uma adicional em 312 nm (Figura 30).

Figura 30 - Espectro do corante Disperse Orange 1 solubilizado em DMSO nas seguintes concentrações: $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (cor preta); $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L (cor vermelha); $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (cor verde) e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (cor azul).

Em análises espectrofotométricas, recomenda-se a utilização da concentração cuja absorbância se aproxime de 1. Assim, a melhor condição de trabalho foi estabelecida como sendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L.

4.3 Metabolização dos corantes por meio da mistura S9 *in vitro*

Após o estabelecimento da concentração ideal dos corantes, foram utilizados volumes diferentes de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com o indutor enzimático Aroclor-1254 (S9), variando entre 50 a 300 μL , para verificar qual seria a condição que levaria à melhor metabolização. Para os três corantes, a melhor condição de metabolização foi obtida utilizando 300 μL de S9. Durante esta reação, foi observada a precipitação de proteínas que prejudicava a leitura espectrofotométrica (dados não mostrados). Por este motivo, foi feita a extração de todas as amostras com diclorometano. E então, os extratos foram ressuspensos com metanol, a fim de serem injetados no CLAE/DAD e novamente no espectrofotômetro. Os resultados estão mostrados nas Figuras 31 a 33 e pode-se perceber que todos os corantes estudados sofreram metabolização em presença do sistema de metabolização exógeno (fração S9), demonstrada pela redução das bandas características. As Figuras 31 (A), 32 (A) e 33 (A) mostram os espectros de absorção na região UV-Vis dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, respectivamente, antes e após a reação com o S9. Enquanto que as figuras 31 (B), 32 (B) e 33 (B) ilustram os cromatogramas do CLAE/DAD, obtidos antes e após as reações dos corantes estudados com o S9.

Figura 31 - Resultados obtidos após a reação do corante Disperse Red 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) com 300 μL de S9 (4% v/v) seguida de extração com diclorometano. Sendo (A) o espectro de absorção na região UV-Vis e (B) cromatograma de CLAE/DAD, utilizando fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μL , temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}} = 502 \text{ nm}$.

Figura 32 - Resultados obtidos após a reação do corante Disperse Red 13 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) com 300 μ L de S9 (4% v/v) seguida de extração com diclorometano. Sendo (A) o espectro de absorção na região UV-Vis e (B) cromatograma de CLAE/DAD, utilizando fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}} = 530$ nm.

Figura 33 - Resultados obtidos após a reação do corante Disperse Orange 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) com 300 μ L de S9 (4% v/v) seguida de extração com diclorometano. Sendo (A) o espectro de absorção na região UV-Vis e (B) cromatograma de CLAE/DAD, utilizando fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}} = 483$ nm.

4.4 Simulação de reações de oxidação e redução *in vitro* dos corantes estudados por espectroeletroquímica

Os corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 apresentam em sua estrutura química o grupo azo ($N=N$). Sabe-se que se esta ligação for quebrada pela oxidação ou redução dos corantes, podem ser produzidos diversos produtos, como as aminas aromáticas. Estes compostos podem apresentar alta mutagenicidade e isso implica dano ambiental quando os corantes são lançados nos corpos d'água e estes não são devidamente tratados, ou prejuízo à saúde humana quando a quebra do grupo azo ocorre no interior do organismo.

Deste modo, foi desenvolvido um método eletroquímico pelo grupo do Instituto de Química da UNESP de Araraquara capaz de simular a oxidação e a redução destes corantes estudados, mimetizando as condições biológicas de biotransformação do grupamento cromóforo.

Para estas análises foi utilizada a mesma concentração dos corantes estabelecida no item 4.2, ou seja, $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L.

4.4.1 Caracterização espectroeletroquímica dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Red 1

Os experimentos de oxidação espectroeletroquímica do corante Disperse Red 1 em DMSO/TBAPF₄ 0,1 mol/L foram realizados sob potencial de +1,5 V. Os espectros foram monitorados no potenciostato/espectrofotômetro até que a reação se estabilizasse, com medidas a cada 10 minutos.

Analizando a Figura 34, observa-se que a banda característica do cromóforo do corante Disperse Red 1 (em 510 nm) foi reduzindo ao longo da eletrólise, mas a partir de 50 minutos ocorreu a estabilização, pois não houve alteração da absorbância em 510 nm até o tempo máximo de análise de 1 hora e trinta minutos (na Figura 34 está mostrado até o tempo de 50 minutos). A diminuição da absorbância da banda característica do grupamento azo em função do tempo, no comprimento de onda de 510 nm, é demonstrada na Figura 35-A que mostra claramente que a reação de oxidação é capaz de alterar esse grupo. Durante a eletrólise, observou-se também que ocorreu uma descoloração da solução inicial do

corante vermelho, o que comprova que esta reação foi capaz de modificar o grupo azo, responsável pela cor.

É importante notar que durante a reação de oxidação ocorreu a formação tempo dependente de um produto com pico em 635 nm (Figura 34), com absorbância máxima de 0,677 no tempo de 40 minutos, que depois começou a decair (Figura 35-B). Sugere-se que durante a oxidação do Disperse Red 1, nas condições estabelecidas, tenha sido formado um radical instável como consequência da oxidação, provavelmente formado devido à perda de elétron durante esta reação. Este radical pode ser um hidrazo, que é gerado como intermediário da quebra da ligação azo.

Figura 34 - Espectros obtidos durante a oxidação eletroquímica do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L). Os espectros foram registrados a cada 10 minutos de reação sob potencial fixo de +1,5 V. A linha preta corresponde ao t=0; vermelha t=10 min; verde clara t=20 min; azul escura t=30 min; azul clara t=40 min e lilás t=50 min.

Figura 35 - (A) Monitoramento da ligação azo (cromóforo) durante a reação de oxidação do corante Disperse Red 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ 0,1 mol/L) sob potencial fixo de +1,5 V em função do tempo, considerando o comprimento de onda de 510 nm. (B) Monitoramento da formação do radical durante a reação de oxidação a potencial de +1,5 V do corante Disperse Red 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ 0,1 mol/L), em função do tempo, considerando o comprimento de onda de 635 nm.

A eletrólise com potencial de oxidação do corante promove a supressão da banda do cromóforo em 63% após 50 minutos de eletrólise, como mostra a Figura 36.

Figura 36 - Espectro do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ antes da oxidação (A=1,004) (em preto) e após 50 minutos de oxidação (A= 0,374) (em vermelho) sob potencial fixo de +1,5 V, considerando o comprimento de onda de 510 nm.

Estes resultados mostraram que a reação de oxidação (potencial +1,5 V) é capaz de modificar o grupamento cromóforo (ligação azo) do corante Disperse Red 1. Com o objetivo de determinar se este efeito ocorre também em situações de redução, os experimentos foram repetidos utilizando o potencial de -1,5 V.

A Figura 37 mostra os espectros de UV-Vis obtidos durante eletrólise do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,1 mol/L sob potencial de redução de -1,5 V.

Figura 37 - Espectros obtidos durante a redução eletroquímica do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 2 horas e 10 minutos sob potencial fixo de -1,5 V. As cores dos traçados (vermelho, verde, azul escuro, azul claro, lilás, amarelo, cinza, roxo, púrpura, marrom, verde escuro, verde musgo, cinza azulado e laranja) correspondem às medidas a cada 10 minutos, sendo a vermelha o t=0 min. e a laranja t=130 min.

Como se pode observar na Figura 37, a reação de redução do corante não foi muito eficaz na alteração do grupamento cromóforo. Portanto decidiu-se adicionar ácido acético glacial (na proporção de 0,3%) com o intuito de fornecer prótons, que ajudam a reduzir a densidade eletrônica no grupo azo facilitando a reação de redução.

Nesta condição ácida, a redução eletroquímica ocorre a partir do tempo de 10 minutos de eletrólise. Isso pode ser observado pelo decaimento da banda do cromóforo em torno de 510 nm. O experimento foi realizado até o tempo máximo de 1 hora e 50 minutos, porém, após 60 minutos ocorreu a estabilização, não sendo mais observado o decaimento da absorbância. Nas condições testadas de redução do Disperse Red 1 não foi detectada a formação de um novo pico, o que sugere que os possíveis radicais formados sejam muito instáveis ou que não poderiam ser detectados nas condições testadas (Figura 38).

Figura 38 - Espectros obtidos durante a redução do corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L), acrescido de 0,3 % de ácido acético. Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 60 minutos sob potencial fixo de -1,5 V. A linha preta corresponde ao t=0; vermelha t=10 min; verde clara t=20 min; azul escura t=30 min; azul clara t=40 min; lilás t=50 min e amarela t=60 min.

Nas condições testadas, a redução do corante promove a supressão de apenas 30% da banda do cromóforo após 60 minutos de eletrólise (Figura 39).

Figura 39 - Espectros do Corante Disperse Red 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L) antes da redução (A=1,193) (em preto) e após 60 minutos de redução (A= 0,825) (em vermelho) sob potencial fixo de -1,5 V, considerando o comprimento de onda de 510 nm.

4.4.2 Caracterização espectroeletroquímica dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Red 13

Os experimentos de oxidação espectroeletroquímica do corante Disperse Red 13 foram realizados nas mesmas condições descritas para o Disperse Red 1, porém o tempo total de eletrólise foi de 2 horas e 40 minutos (na Figura 40 estão mostrados os resultados até 60 min).

De acordo com a Figura 40, observa-se que a oxidação do corante Disperse Red 13 levou a uma diminuição da banda do cromóforo a $\lambda=530$ nm após 20 minutos de eletrólise, que foi decrescendo até o tempo de 60 minutos, quando ocorreu a estabilização da reação. Durante a eletrólise, também foi observada a descoloração da solução inicial do corante vermelho, o que confirma a modificação do grupo cromóforo.

Similarmente ao que ocorreu com o corante Disperse Red 1, uma nova banda foi formada em 608 nm (Figura 40) com absorbância máxima de 0,390 no tempo de 40 minutos que depois começou a decair (Figura 41-B). Sugere-se que durante a oxidação do corante Disperse Red 13 nas condições estabelecidas, tenha sido formado um radical instável como consequência da oxidação, da mesma forma como foi observado para o Disperse Red 1. A diminuição da Absorbância do cromóforo em função do tempo, no comprimento de onda de 530 nm, é demonstrada na Figura 41-A.

Figura 40 - Espectros obtidos durante a oxidação do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 60 minutos sob potencial fixo de +1,5 V. A linha preta corresponde ao t=0; vermelha t=10 min; verde t=20 min; azul escura t=30 min; azul clara t=40 min; lilás t=50 min e amarela t=60 min.

Figura 41 - (A) Monitoramento da ligação azo (cromóforo) durante a reação de oxidação do corante Disperse Red 13 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,1 mol/L) sob potencial fixo de +1,5 V em função do tempo, considerando o comprimento de onda de 530 nm. (B) Monitoramento da formação do radical durante a reação de oxidação a potencial de +1,5 V do corante Disperse Red 13 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,1 mol/L), em função do tempo, considerando o comprimento de onda de 608 nm.

A eletrólise do corante promove a supressão de 69% da banda do cromóforo após 60 minutos de eletrólise (Figura 42).

Figura 42 - Espectro do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L) antes da oxidação (A= 0,599) (em preto) e após 60 minutos de oxidação (A= 0,188) (em vermelho) sob potencial fixo de +1,5 V, considerando o comprimento de onda de 530 nm.

De forma análoga ao que foi testado para o outro corante vermelho estudado, também foi avaliada a capacidade de clivagem redutiva da ligação azo. Conforme discutido no item 4.4.1, foi adicionado ácido acético para facilitar a reação.

A Figura 43 mostra os espectros de UV-Vis obtidos durante eletrólise do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ em condição ácida sob potencial de redução de -1,5 V. A redução eletroquímica ocorre a partir do tempo de 10 minutos de eletrólise. Isso pode ser observado pelo decaimento da banda do cromóforo em torno de 530 nm. Este decaimento ocorreu até o tempo máximo de 80 minutos, sendo que a partir daí ocorreu a estabilização. Igualmente ao que foi observado para o corante Disperse Red 1, não ocorreu a formação de um novo pico.

Figura 43 - Espectros obtidos durante a redução eletroquímica do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L), acrescido de 0,3 % de ácido acético. Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 80 minutos sob potencial fixo de -1,5 V. A linha preta corresponde ao t=0; vermelha t=10 min; verde clara t=20 min; azul escura t=30 min; azul clara t=40 min; lilás t=50 min; amarela t=60 min; verde musgo t=70 min e roxa t=80 min.

Da mesma forma que já descrito anteriormente, a redução não foi tão eficaz na modificação da ligação azo, como é a oxidação. Ainda que na presença de ácido acético, a redução do corante promoveu a supressão de apenas 39% da banda do cromóforo após 80 minutos de eletrólise (Figura 44).

Figura 44 - Espectros do corante Disperse Red 13 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ (0,1 mol/L) antes da redução ($A=0,766$) (em preto) e após 80 minutos de redução ($A= 0,464$) (em vermelho) sob potencial fixo de -1,5 V, considerando o comprimento de onda de 530 nm.

4.4.3 Caracterização espectroeletroquímica dos produtos de oxidação e redução do corante Disperse Orange 1

Os experimentos de oxidação espectroeletroquímica do corante Disperse Orange 1 foram realizados na mesma concentração também sob potencial de +1,5 V. O tempo máximo de eletrólise foi de 40 minutos, mas em 10 minutos já ocorreu a estabilização da oxidação. Assim, o experimento foi repetido com medidas realizadas a cada 2 minutos, para melhor monitorar a reação (Figura 45). Nesta condição, a oxidação do corante Disperse Orange 1 só foi iniciada a partir de 30 minutos. Acredita-se que isso ocorreu pelo fato de que, a cada 2 minutos, a reação de oxidação era interrompida para fazer a medida, então isso pode ter retardado o processo oxidativo, haja vista que no experimento anterior a medida era feita a cada 10 minutos. Na Figura 45, também é possível observar que, após 30 minutos de oxidação, ocorre a formação de um pico no comprimento de onda de 675 nm. Esta elevação da absorvância pode indicar a formação de novos produtos oriundos da oxidação química. Assim, neste

experimento também foi observada claramente a formação de radicais durante a reação, da mesma forma que foi observado para os outros corantes estudados.

Figura 45 - Espectros obtidos durante a oxidação eletroquímica do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ (0,1 mol/L). Espectros registrados a cada 2 minutos de eletrólise até o tempo de 38 minutos sob potencial fixo de +1,5 V. A linha preta corresponde ao t=0; vermelha t=28 min; azul claro t=30 min; verde musgo t=32 min; azul escuro t=34 min; laranja t=36 min e azul t=38 min.

Durante a eletrólise, observou-se também que ocorreu uma descoloração da solução inicial do corante Disperse Orange 1, o que ressalta que este fenômeno seja devido à modificação do grupo cromóforo. A diminuição da absorvância em função do tempo, no comprimento de onda de 490 nm, é demonstrada na Figura 46-A. Observa-se que o tempo inicial demonstrado no gráfico é de 28 minutos de oxidação, porque este corante iniciou o seu processo oxidativo a partir de 30 minutos de análise. É importante lembrar que durante a reação de oxidação ocorreu a formação tempo dependente de um produto com pico em 675 nm, com absorvância máxima de 1,221 no tempo de 36 minutos que depois começou a decair (Figura 46-B).

Figura 46 - (A) Monitoramento ligação azo (cromóforo) durante a reação de oxidação do corante Disperse Orange 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,1 mol/L) sob potencial fixo de +1,5 V em função do tempo, considerando o comprimento de onda de 490 nm. (B) Monitoramento da formação do radical durante a reação de oxidação a potencial de +1,5 V do corante Disperse Orange 1 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,1 mol/L), em função do tempo, considerando o comprimento de onda de 675 nm.

A oxidação do corante promove a supressão da banda do cromóforo em 65% após 38 minutos de eletrólise (Figura 47).

Figura 47 - Espectro do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ (0,1 mol/L) antes da oxidação (A=0,792) (em preto) e após 38 minutos de oxidação (A= 0,276) (em vermelho) sob potencial fixo de +1,5 V, considerando o comprimento de onda de 490 nm.

A redução eletroquímica ocorre a partir do tempo de 10 minutos de eletrólise (Figura 48). Isso pode ser observado pelo decaimento da banda do cromóforo em torno de 490 nm. Este decaimento ocorreu até o tempo máximo de 70 minutos, sendo que a partir daí ocorreu a estabilização. Nos comprimentos de onda superiores a 490 nm não ocorreu a formação de um novo pico, o que sugere que os possíveis radicais formados são muito instáveis ou não foi possível a detecção nestas condições de trabalho. Portanto, pode-se observar que os resultados obtidos para os três corantes foram muito semelhantes.

Figura 48 - Espectros obtidos durante a redução simultânea do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ (0,1 mol/L) mais 0,3 % de ácido acético. Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 70 minutos sob potencial fixo de -1,5 V. A linha preta corresponde ao t=0; vermelha t=10 min; verde clara t=20 min; azul escura t=30 min; azul clara t=40 min; lilás t=50 min; amarela t=60 min e verde musgo t=70 min.

A redução do corante promove a supressão da banda do cromóforo em 37% após 70 minutos de eletrólise (Figura 49).

Figura 49 - Espectros do corante Disperse Orange 1 a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ (0,1 mol/L) antes da redução ($A=0,720$) (em preto) e após 70 minutos de redução ($A= 0,455$) (em vermelho) sob potencial fixo de -1,5 V, considerando o comprimento de onda de 490 nm.

4.5 Eletrólise a Potencial Controlado

Como já explicado no item Material e Métodos, os experimentos por eletrólise a potencial controlado foram realizados como outra ferramenta na avaliação do comportamento eletroquímico dos corantes e também com o objetivo de gerar maiores quantidades dos produtos de oxidação e redução dos corantes para serem analisados por CLAE/DAD, CG/EM e nos ensaios de mutagenicidade, utilizando células de linfomas de camundongos e *Salmonella*. Por esta técnica, a oxidação e a redução ocorrem em todo o conteúdo (25 mL da solução do corante), enquanto que na análise espectroeletroquímica a reação só ocorre onde atinge a luz UV-visível (solução do corante próxima aos fios de ouro e platina) e também o volume resultante do produto oxidado/reduzido é pequeno (aproximadamente 2 mL).

4.5.1 Perfil espectrofotométrico na região UV-VIS e análise por CLAE/DAD dos produtos resultantes das reações de oxidação e de redução a potencial controlado dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1

Corante Disperse Red 1

Inicialmente foi preparada a solução do corante Disperse Red 1 a $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L. A oxidação deste corante foi monitorada a cada 30 minutos até completar o tempo total de análise de 2,5 horas. Ao analisar a Figura 50, pode-se dizer que a banda referente ao cromóforo já foi praticamente suprimida após 30 minutos de eletrólise a potencial controlado. Portanto, o espectro de absorção do corante Disperse Red 1 mostra que a oxidação deste corante poderia ocorrer via clivagem do grupo azo da molécula ou devido apenas a uma deslocalização eletrônica ao longo da molécula.

Figura 50 - Espectros de absorção na região UV-VIS durante a oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1 em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Sob potencial de +1,5 V.

Foram analisadas as amostras antes e após 30 minutos, 60 minutos, 2 horas e 2,5 horas de oxidação eletroquímica do corante Disperse Red 1, conforme mostra a Figura 51.

O cromatograma obtido para detecção no comprimento de onda correspondente à máxima absorção do cromóforo ($\lambda=502$ nm) mostra que o tempo de retenção foi de 5,1 minutos para o corante Disperse Red 1.

Figura 51 - Cromatograma de oxidação $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Em todos foram aplicados +1,5 V. Fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}}=502$ nm.

A solução do corante Disperse Red 1 a $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBAPF₄ 0,01 mol/L foi submetida a 2,5 horas de redução, sendo que nesse ensaio de redução eletroquímica as soluções foram previamente submetidas a desaeração por 10 minutos através do borbulhamento de N₂ (99,7% de pureza). Foi feito o monitoramento da reação a cada 30 minutos sendo que a banda correspondente ao grupo cromóforo foi totalmente suprimida apenas após 2 horas de eletrólise, como mostram as Figuras 52 e 53.

Figura 52 - Espectros de absorção na região UV-VIS durante a redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1 em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Sob potencial de -1,5 V.

Foram analisadas as amostras antes e após 30 minutos, 60 minutos, 2 horas e 2,5 horas de redução eletroquímica do corante Disperse Red 1, conforme mostra a Figura 53. O cromatograma obtido para detecção no comprimento de onda correspondente à máxima absorção do cromóforo ($\lambda=502$ nm) mostra que o tempo de retenção foi de 5,1 minutos para o corante Disperse Red 1. Vale ressaltar que este tempo coincide com o obtido no processo de oxidação.

Figura 53 - Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Em todos foram aplicados -1,5 V. Fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}}=502$ nm.

Corante Disperse Red 13

Foi realizado o mesmo procedimento para o corante Disperse Red 13. A solução do corante Disperse Red 13 a $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L sofreu a redução da banda do grupo azo a partir de 30 minutos de eletrólise, sendo que esta supressão foi total no tempo de 60 minutos. Fazendo-se uma comparação entre as Figuras 50 e 54, pode-se dizer que o corante Disperse Red 1 sofreu o processo de oxidação total mais rápido (30 minutos) que o corante Disperse Red 13 (60 minutos).

Figura 54 - Espectros de absorção na região UV-VIS durante a oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13 em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Sob potencial de +1,5 V.

Foram analisadas as amostras antes e após 30 minutos, 60 minutos, 2 horas e 2 horas e meia de oxidação eletroquímica do corante Disperse Red 13, conforme mostra a Figura 55. O cromatograma obtido para detecção no comprimento de onda correspondente à máxima absorção do cromóforo ($\lambda=530$ nm) mostra que o tempo de retenção foi de 7,0 minutos para o corante Disperse Red 13.

Figura 55 - Cromatograma de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Em todos foram aplicados +1,5 V. Fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}}=530$ nm.

O processo de redução foi realizado nas mesmas condições que a oxidação, sendo que a única diferença é que as soluções foram previamente submetidas à desaeração por 10 minutos através do borbulhamento de N_2 (99,7% de pureza).

A solução do corante Disperse Red 13 a $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L foi submetida a 2,5 horas de redução. Foi feito o monitoramento da reação a cada 30 minutos, sendo que a banda correspondente ao grupo cromóforo foi totalmente suprimida em 30 minutos de eletrólise (Figura 56). Observe que este corante foi reduzido mais rapidamente que o corante Disperse Red 1, que levou 2 horas para que o pico fosse completamente suprimido.

Figura 56 - Espectros de absorção na região UV-VIS durante a redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13 em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Sob potencial de -1,5 V.

Foram analisadas as amostras antes e após 30 minutos, 60 minutos, 2 horas e 2,5 horas de redução eletroquímica do corante Disperse Red 13, conforme mostra a Figura 57.

O tempo de retenção foi o mesmo obtido no processo de oxidação (7,0 minutos). Durante o processo de redução, observou-se que além de ocorrer a diminuição do pico, também ocorreu um deslocamento do mesmo, conforme mostra a Figura 57. Esse deslocamento verificado no espectro do corante Disperse Red 13 em relação ao espectro das demais moléculas dos corantes azo analisados é atribuído à presença de uma molécula de cloro adjacente ao grupo azo.

Figura 57 - Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Em todos foram aplicados -1,5 V. Fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}}=530$ nm.

Corante Disperse Orange 1

Foi realizado o mesmo procedimento dos demais corantes estudados. A solução do corante Disperse Orange 1 a $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L foi submetida a 2,5 horas de oxidação. Foi feito o monitoramento da reação a cada 30 minutos, sendo que a banda correspondente ao grupo cromóforo foi totalmente suprimida após 2,5 horas de eletrólise, como mostra a Figura 58. Ao fazer a comparação entre as Figuras 50, 54 e 58, percebe-se que foi necessário um maior tempo (2,5 horas) para que ocorresse o suprimento total do pico desse corante em relação aos outros corantes estudados: Disperse Red 1 sofreu o processo de oxidação total em 30 minutos e Disperse Red 13 em 60 minutos.

Figura 58 - Espectros de absorção na região UV-VIS durante a oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1 em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Sob potencial de +1,5 V.

Foram analisadas as amostras antes e após 30 minutos, 60 minutos, 2 horas e 2 horas e meia de oxidação eletroquímica do corante Disperse Orange 1, conforme mostra a Figura 59. O cromatograma obtido para detecção no comprimento de onda correspondente à máxima absorção do cromóforo ($\lambda=483$ nm) mostra que o tempo de retenção foi de 11,8 minutos para esse corante em estudo.

Ao observar a Figura 59, pode-se notar que além de ocorrer a diminuição do pico correspondente ao grupo cromóforo, também ocorre a formação de outros picos. Isso demonstra a modificação do grupo azo e a formação de novos produtos oriundos do processo oxidativo.

Figura 59 - Cromatograma de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Em todos foram aplicados +1,5 V. Fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}}=483$ nm.

O processo de redução foi realizado nas mesmas condições que os demais corantes. A solução do corante Disperse Orange 1 a $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L foi submetida a 2,5 horas de redução. Foi feito o monitoramento da reação a cada 30 minutos, sendo que a banda correspondente ao grupo cromóforo foi totalmente suprimida em 60 minutos de eletrólise (Figura 60).

A ordem de velocidade para que ocorresse o processo de redução foi: Disperse Red 13>Disperse Orange 1>Disperse Red 1, pois o corante Disperse Red 13 foi reduzido totalmente em 30 minutos, Disperse Orange 1 em 60 minutos e Disperse Red 1 em 2 horas.

Figura 60 - Espectros de absorção na região UV-VIS durante a redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1 em DMSO/TBABF₄ 0,01 mol/L. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Sob potencial de -1,5 V.

Foram analisadas as amostras antes e após 30 minutos, 60 minutos, 2 horas e 2,5 horas de redução eletroquímica do corante Disperse Orange 1, conforme mostra a Figura 61.

O tempo de retenção foi o mesmo obtido no processo de oxidação (11,8 minutos). Durante o processo de redução, observou-se que além de ocorrer a diminuição do pico, também foram gerados novos picos, conforme mostra a Figura 61. Tal fato foi observado nos dois processos: oxidativo e o redutivo, o que mostra que também ocorreu a modificação do grupo azo e a formação de novos produtos oriundos desses processos.

Figura 61 - Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1. Sendo que cada letra corresponde a: (a) = sem eletrólise; (b) = após 30 minutos de eletrólise; (c) = após 60 minutos de eletrólise; (d) = após 2 horas de eletrólise; (e) = após 2,5 horas de eletrólise. Em todos foram aplicados -1,5 V. Fase móvel acetonitrila:água (80:20), fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 μ L, temperatura ambiente para a coluna e $\lambda_{\text{análise}}=483$ nm.

4.6 Identificação das amins e de outros produtos formados após os processos de oxidação e redução

Na tentativa de identificar os produtos formados após a oxidação e a redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, foi feita a análise dos produtos obtidos ao final da técnica de eletrólise a potencial controlado e após a reação com S9 por CLAE/DAD, utilizando o método padronizado por Lizier (2009) para detecção de amins aromáticas.

A Figura 62 mostra o cromatograma obtido após a oxidação a potencial controlado do corante Disperse Red 1. Pode-se observar que foram formados os seguintes produtos: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada com tempo de retenção (t_R) de 10,0 minutos e nitrobenzeno ($t_R = 12,0$ min), na proporção de 6% e 7%, respectivamente, após 2,5 horas de oxidação.

Figura 62 - Cromatograma do produto de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1 a potencial controlado por 2,5 horas. Pico 1: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada $t_R = 10,0$ minutos. Pico 2: nitrobenzeno $t_R = 12,0$ minutos. Condições cromatográficas: fase móvel= MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, $\lambda = 230$ nm e volume injetado= 20 μ L.

Após a reação de oxidação utilizando a fração S9, que mimetiza as reações hepáticas do citocromo P450, também foi observada a formação de sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, porém, na proporção de 5%. O nitrobenzeno não foi detectado após a reação com S9 (Figura 63).

Figura 63 - Cromatograma do produto de oxidação pelo S9 de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1. Pico 1: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada $t_R = 10,0$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, $\lambda = 230$ nm e volume injetado=20 μ L.

A redução eletroquímica do corante também formou a mesma amina (sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada), na proporção de 9%. O nitrobenzeno também não foi detectado nesta condição (Figura 64).

Figura 64 - Cromatograma do produto de redução eletroquímica a potencial controlado de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1. Pico 1: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada $t_R = 10,0$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ =230 nm e volume injetado=20 μ L.

A oxidação do corante Disperse Red 13 a potencial controlado também gerou a amina sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, porém em uma proporção menor, 3%. Ainda pode ser observado que também foi formada a amina 2-cloro-4-nitro-benzamina ($t_R = 11,5$ min.), na proporção de 4% (Figura 65).

Figura 65 - Cromatograma do produto de oxidação a potencial controlado de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13. Pico 1: sulfato 2-[(4-aminofenil) etilamino]- etanol monohidratada $t_R = 10,0$ minutos. Pico 2: 2-cloro-4-nitro-benzamina $t_R = 11,5$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ =230 nm e volume injetado=20 μ L.

Já na oxidação por S9, somente a 2-cloro-4-nitro-benzamina foi detectada, na proporção de 22% (Figura 66).

Figura 66 - Cromatograma do produto de oxidação pelo S9 de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13. Pico 1: 2-cloro-4-nitro-benzamina, $t_R = 11,5$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ =230 nm e volume injetado=20 μ L.

A redução eletroquímica do Disperse Red 13 foi muito semelhante ao Disperse Red 1, ou seja, foi formada a amina sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]-etanol monohidratada, na proporção de 6% (Figura 67).

Figura 67 - Cromatograma do produto de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13. Pico 1: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]-etanol monohidratada $t_R = 10,0$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ =230 nm e volume injetado=20 μ L.

No caso do corante Disperse Orange 1, a oxidação a potencial controlado gerou benzamina ($t_R = 5,2$ min.) e nitrobenzeno ($t_R = 12$ min), nas proporções de 45% e 77%, respectivamente, após 2,5 horas de oxidação (Figura 68).

Figura 68 - Cromatograma do produto de oxidação a potencial controlado de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1. Pico 1: benzamina $t_R = 5,2$ minutos. Pico 2: nitrobenzeno $t_R = 12,0$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, $\lambda = 230$ nm e volume injetado= 20 μ L.

A ação do S9 sobre o corante Disperse Orange 1 gerou a benzamina ($t_R = 11,5$ min.), na proporção de 33% (Figura 69).

Figura 69 - Cromatograma do produto de oxidação pelo S9 de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1. Pico 1: benzamina $t_R = 5,2$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, $\lambda = 230$ nm e volume injetado=20 μ L.

A Figura 70 mostra a formação de benzamina ($t_R = 5,2$ min.) após a redução a potencial controlado do corante Disperse Orange 1. Nesta condição foi detectada grande quantidade desta amina, cerca de 90%.

Figura 70 - Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1. Pico 1: benzamina $t_R = 5,2$ minutos. Condições cromatográficas= fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 50:50 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ =230 nm e volume injetado=20 μ L.

A Tabela 8 mostra a estrutura dos diferentes produtos formados após as reações de oxidação (tanto a potencial controlado, quanto por S9) e de redução dos três corantes estudados, bem como os respectivos tempos de retenção.

Tabela 8 - Estrutura química e os tempos de retenção dos produtos gerados após a oxidação e a redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, nas condições padronizadas neste trabalho: CLAE/DAD - fase móvel: MeOH/Tampão fosfato $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L (pH = 6,9), 50:50 (v/v) e 20 mM de trietilamina.

Composto identificado	Disperse Red 1		Disperse Red 13		Disperse Orange 1	
	Oxi.	Red.	Oxi.	Red.	Oxi.	Red.
t_R em minutos						
 sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]-etanol monohidratada	10	10	10	10		
 2-cloro-4-nitro-benzamina			11,5			
 benzamina					5,2	5,2
 nitrobenzeno	12				12	

A Tabela 9 mostra os parâmetros que foram utilizados tanto para construir as curvas analíticas (Apêndice C) como para determinar a concentração de cada produto formado após a oxidação e a redução dos corantes (Tabela 10). Para isso, foi utilizada a equação da reta, sendo que A corresponde ao coeficiente linear da reta, B é o coeficiente angular e a área é aquela encontrada no pico representado pelos cromatogramas (Figuras 62 a 70) obtidos pelo CLAE/DAD. Portanto, a equação da reta é representada por:

$$\text{Área do pico} = A + B \times [\text{concentração do composto}]$$

Na Tabela 9 encontram-se também: a faixa de linearidade, a qual corresponde à faixa de concentração onde a curva analítica é linear; o número de pontos dessa curva (N); o coeficiente de correlação (R), que mostra o quanto os pontos estão alinhados; o desvio padrão (DP); o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). É importante salientar que este método já estava validado e padronizado pelo grupo do Instituto de Química da UNESP (LIZIER, 2009).

Tabela 9 - Parâmetros correspondentes às respectivas curvas analíticas obtidas para cada padrão selecionado por CLAE/DAD nas seguintes condições otimizadas: injeção de 20 µL de solução padrão em metanol, T = 40°C, vazão = 1,0 mL/min, λ =230 nm, fase móvel = MeOH/Tampão fosfato 5,0 x 10⁻⁵ mol/L (pH=6,9), 50:50 (v/v) e 20 mM de trietilamina.

Aminas	A	B	Faixa de Linearidade**	N	R	DP	L.D.*	L.Q.*
sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada	114194,21	1,36x10 ¹⁰	7,10x10 ⁻⁷ a 1,82x10 ⁻⁴	4	0,998	0,42	0,40	1,22
2-cloro-4-nitro-benzamina	76292,25	3,86x10 ¹⁰	2,84x10 ⁻⁶ a 1,82x10 ⁻⁴	4	0,999	0,65	0,25	0,77
benzamina	82195,13	1,37x10 ¹¹	7,10x10 ⁻⁷ a 1,82x10 ⁻⁴	4	0,999	1,37	0,036	0,108
nitrobenzeno	25752,63	7,43x10 ⁹	9,77x10 ⁻⁶ a 5,00x10 ⁻³	6	0,998	12,6	0,051	0,15

*L.D. e L.Q. em ppm; ** Faixa de linearidade em mol/L;

Tabela 10 - As concentrações em mol/L de cada produto formado após a oxidação e a redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1.

Composto identificado	Disperse Red 1		Disperse Red 13		Disperse Orange 1	
	Oxi.	Red.	Oxi.	Red.	Oxi.	Red.
Concentrações em mol/L						
sulfato 2-[(4-aminofenil) etilamino]- etanol monohidratada	$1,88 \times 10^{-5}$	$2,88 \times 10^{-5}$	$9,88 \times 10^{-6}$	$1,88 \times 10^{-5}$		
2-cloro-4-nitro-benzamina			$1,22 \times 10^{-5}$			
benzamina					$1,44 \times 10^{-4}$	$2,88 \times 10^{-4}$
nitrobenzeno	$2,23 \times 10^{-5}$				$2,45 \times 10^{-4}$	

Foi feita outra análise dos produtos de oxidação e redução dos corantes pelo CLAE/DAD, a fim de tentar identificar outras aminas que poderiam ser formadas utilizando o método padronizado por Lizier (2009), com as seguintes condições: fase móvel = MeOH/Tampão Fosfato 80:20 (pH=6,9, 30 μ M), temperatura de 40°C e vazão=1,0 mL/min. No entanto, nenhum produto foi encontrado. Os cromatogramas referentes a essas análises estão apresentados no Apêndice D.

Confirmação das análises dos produtos obtidos após as reações de oxidação e redução dos corantes via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Soluções dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 a $6,0 \times 10^{-3}$ mol/L foram submetidas a 4 horas de oxidação e redução através da técnica de eletrólise a potencial controlado. A seguir os produtos de oxidação e redução dos três corantes foram identificados pelo CG/EM.

As análises das reações de redução e de oxidação dos corantes em estudo via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, resultaram na identificação de 7 compostos de degradação, os quais são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Estrutura química e os tempos de retenção dos produtos gerados após a oxidação e a redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 obtidos após a injeção das soluções resultantes dos corantes a $6,0 \times 10^{-3}$ mol/L no CG/EM.

Composto identificado	Disperse Red 1		Disperse Red 13		Disperse Orange 1	
	Oxi.	Red.	Oxi.	Red.	Oxi.	Red.
t_R em minutos						
 4-nitro-benzamina	13,575	13,510		13,510		
 2-(etilfenilamino)-etanol		12,120		12,045		
 2-cloro-4-nitro-benzamina			14,220	14,210		
 benzamina						5,225
 nitrobenzeno					7,615	7,555
 N-fenil-benzamina					13,635	13,590
 N-fenil-1,4-benzenodiamina					16,140	16,120

Pode-se notar que, de um modo geral, os compostos identificados correspondem às quebras simples das moléculas dos corantes originais, e que, em alguns casos, foi obtido um mesmo composto de degradação para mais de um corante, por exemplo: 4-nitro-benzamina e 2-(etilfenilamino)-etanol.

Além disso, comparando-se as Tabelas 8 e 11 pode-se observar que pela análise do CG/EM foram identificados mais quatros compostos diferentes em relação à análise feita pelo CLAE/DAD: 4-nitro-benzamina, 2-(etilfenilamino)-etanol, N-fenil-benzamina e N-fenil-1,4-benzenodiamina. Os compostos 2-cloro-4-nitro-benzamina, benzamina e nitrobenzeno encontrados pelo CLAE/DAD foram confirmados pela análise no CG/EM, no entanto, comparando os resultados obtidos pelos dois equipamentos nota-se que pelo CG/EM a substância 2-cloro-4-nitro-benzamina apareceu tanto após a oxidação como após a redução do corante Disperse Red 13, já pelo CLAE/DAD este composto aparece apenas após a oxidação desse corante. A benzamina, pela análise no CG/EM, foi formada somente após a redução do corante Disperse Orange 1, enquanto que pelo CLAE/DAD este composto foi identificado tanto depois da oxidação como após a redução desse corante. Por fim, o nitrobenzeno foi identificado, pelo CG/EM, após a oxidação e a redução do corante Disperse Orange 1, mas pela análise no CLAE/DAD esse composto aparece após a oxidação de dois corantes: Disperse Red 1 e Disperse Orange 1.

As propostas de fragmentação de cada um dos corantes estudados após serem submetidos aos processos de oxidação e de redução estão apresentadas no Apêndice E.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os azo corantes podem ser ingeridos pelos seres humanos e outros seres vivos através do consumo de água ou alimentos contaminados. Então podem sofrer processos de oxidação ou redução no organismo e, conseqüentemente, podem formar produtos mais ou menos tóxicos que as moléculas originais (CHUNG, 1983; UMBUZEIRO 2005b; MANSOUR et al., 2007).

A preocupação de Rehn, em 1895, sobre a ocorrência de cânceres de bexiga urinária em três trabalhadores de uma indústria do “corante anilina” na Alemanha despertou o interesse pelo estudo das aminas carcinogênicas relacionadas aos azo corantes. Este fato acarretou subseqüentes testes de várias substâncias químicas em animais, às quais esses trabalhadores estavam expostos, e a consequente descoberta da atividade carcinogênica para o fígado de camundongos e ratos do azo corante 2,3-dimetil-4-aminoazobenzeno (YOSHIDA, 1933² apud DIPPLE et al., 1985, p. 267). Um composto isômero, N,N-dimetil-4-aminoazobenzeno, foi também posteriormente encontrado como um carcinógeno hepático (KINOSITA, 1936³ apud DIPPLE, 1985, p. 267). Posteriormente, Walpole and Williams empreenderam-se na síntese de análogos de metil de 4-aminobifenil, usados em corantes e na indústria de borracha, baseados na hipótese de que os substituintes metil reduziria a carcinogenicidade. No entanto, esses pesquisadores descobriram que 3-metil-4-aminobifenil e seus compostos relacionados foram, na verdade, mais carcinogênicos e, interessante, deram origem a compostos químicos que induziram o câncer de cólon (WALPOLE, WILLIAMS, 1958; WEISBURGER, 2002). E desde então, um grande número de azo corantes tem sido sintetizados e estão sendo feitos vários estudos a cerca das propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas dos mesmos e de seus metabólitos.

Frente ao exposto, é clara a importância de estudar não somente os corantes originais, mas também os possíveis produtos formados após a metabolização dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, visto que estes compostos são comprovadamente mutagênicos (CHEQUER, 2008, 2009; FERRAZ, 2008, 2010).

---

² YOSHIDA, T. Über die serienweise Verfdgung der Veränderungen der Leber der experimentellen. Hepatomerzeugung dutch o-Amiazotoluol. **Trans. Japan Path. Soc.**, v. 23, p. 636-638, 1933.

³ KINOSITA. Researches on the carcinogenesis of the various chemical substances. **Gann**, Tokyo, v. 30, p. 423-426, 1936.

Inicialmente foram analisados os comportamentos espectroeletroquímicos dos corantes originais em contato tanto com o DNA quanto com o nucleosídeo guanosina, como modelo de base nitrogenada do DNA, com o objetivo de verificar se esses corantes teriam a capacidade de se ligarem ao DNA ou a essa base nitrogenada. Pelos resultados obtidos, observa-se que os corantes estudados foram capazes de interagir com o DNA apenas na maior concentração (0,3 mgDNA/mL). Além disso, pode-se notar que nenhum dos três corantes foi capaz de se ligar à guanosina, e isto pode ser explicado pelo fato de que, apesar deles causarem tanto a mutação cromossômica comprovada pelo Teste de Micronúcleos (CHEQUER, 2008, 2009) como a mutação por deslocamento do quadro de leitura do DNA identificada pelo ensaio *Salmonella*/microsoma (FERRAZ, 2008, 2010), a formação de adutos desses corantes com o DNA, mais especificamente com a guanosina, não é um mecanismo de ação mutagênica relevante.

Adicionalmente, o corante Disperse Red 1 foi testado pelo ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo MLA. Este ensaio permite distinguir largas e pequenas colônias. Acredita-se que pequenas colônias são induzidas por dano genético e as largas colônias pelas mutações gênicas. Assim, seria esperado que amostras positivas no teste de Ames fossem caracterizadas pela indução de largas colônias no MLA (JÄGER; HAFNER; SCHNEIDER, 2004). No entanto, isso não foi observado nos resultados. Tanto o corante Disperse Red 1 como seus produtos de oxidação e de redução apresentaram resultados negativos no MLA, com um maior número de colônias pequenas em relação às grandes, enquanto que no teste de *Salmonella*/microsoma esses compostos apresentaram resultados positivos. Mas Clements (2000) já ponderou que o tamanho da colônia não necessariamente prevê se uma substância química é um mutágeno de ponto ou um agente clastogênico. Em concordância, Jäger, Hafner, Schneider (2004) realizou o MLA em nove produtos de corantes têxteis que apresentaram resultados positivos no Teste de Ames. Desses, apenas 60% induziram efeitos genotóxicos no MLA (ou seja, dos 9 apenas 6 foram positivos no MLA). Em suma, não há correlação clara entre as mutações pontuais no ensaio *Salmonella*/microsoma e a indução de grandes colônias no MLA.

Paralelamente, os produtos de oxidação e redução dos outros dois corantes estudados (Disperse Red 13 e Disperse Orange 1) foram também testados no ensaio *Salmonella*/microsoma, visto que há grande possibilidade de formação de

aminas aromáticas e outros compostos com potencial mutagênico após a biotransformação desses três azo corantes estudados. Como mencionado no item Resultados, os produtos resultantes dos processos de oxidação e de redução do corante Disperse Red 1 apresentaram maior potencial mutagênico, seguido dos produtos do corante Disperse Orange 1 e por último, com menor potencial, estão os produtos do corante Disperse Red 13. Estes resultados concordam parcialmente com o estudo realizado por Osugi (2009) e Ferraz et al. (2010) que analisaram o potencial mutagênico desses três corantes originais: Disperse Red 1 apresentou maior potencial, seguido pelo Disperse Red 13 e Disperse Orange 1. Estes resultados podem ser explicados pela estrutura química de cada corante, haja vista que uma característica importante dos mutágenos genotóxicos ambientais está relacionada com o alto caráter eletrofílico da molécula ou de seus produtos. Esta propriedade aumenta a possível reação com os grupos nucleofílicos do DNA, levando à formação de adutos. Se este efeito genotóxico não é reparado, pode promover a ocorrência de mutação permanente no DNA detectada pelo ensaio *Salmonella* (PINTO; FELZENSZWALB, 2003; OSUGI et al., 2009; FERRAZ et al., 2010).

Em concordância, McCann et al. (1975) relataram uma correlação de 90% entre carcinogenicidade e mutagenicidade para 61 aminas aromáticas e azo corantes testados com o teste de mutagenicidade *Salmonella typhimurium*/microssoma. A transformação dos azo corantes pelas bactérias intestinais pode ser um pré-requisito necessário de carcinogenicidade. Os produtos de degradação desses corantes no intestino podem então ser reabsorvidos pelo trato digestivo e, por sua vez, podem agir adversamente com o tecido corpóreo para formar tumores (McCANN et al., 1975; CHUNG, 1983).

Existem poucos dados na literatura sobre produtos formados após a oxidação dos azo corantes. Sabe-se que se estes são completamente reduzidos a aminas aromáticas, podem ser oxidados a N-hidroxiderivados pelas enzimas do citocromo P450. E assim os radicais N-hidroxi podem ser acetilados pelas enzimas, tais como O-acetiltransferase, e com isso gerarem íons eletrofílicos de nitrênio capazes de reagir com o DNA para formar adutos (BARTSCH, 1981; ARLT et al., 2002).

Nas análises por CLAE/DAD, observou-se que após a oxidação química do corante Disperse Red 1 formou-se sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada e nitrobenzeno, nas proporções de 6% e 7%, respectivamente. A

oxidação do Corante Disperse Red 13 gerou sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]-etanol monohidratada, na proporção de 3% e 2-cloro-4-nitro-benzamina, 4%; e após a oxidação química do Corante Disperse Orange 1: benzamina e nitrobenzeno, nas proporções de 45% e 77%, respectivamente. Na análise por CG/EM, os compostos 2-cloro-4-nitro-benzamina e nitrobenzeno foram confirmados e, além desses, outros produtos foram identificados: 4-nitro-benzamina após a oxidação química do corante Disperse Red 1; N-fenil-benzamina e N-fenil-1,4 benzenodiamina como produtos da oxidação química do corante Disperse Orange 1.

Além do processo oxidativo, as reações de redução são de extrema importância no caso da exposição via oral aos corantes. Nesta situação, a ligação azo é clivada, principalmente pelas enzimas azorredutases, com a consequente formação de aminas aromáticas. Como citado anteriormente, a azorredução em sistemas de mamíferos é catalisada pelas enzimas hepáticas no fígado e pelas bactérias com atividade azorredutase no trato gastrointestinal, sendo que estas últimas são as mais ativas (WATABE et al., 1980; CERNIGLIA et al., 1982; COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993; RAFFI; HALL; CERNIGLIA, 1997). A atividade azorredutase também já foi detectada *in vitro* após absorção percutânea e metabolismo de três azo corantes: fenilazofenol, fenilazo-2-naftol e ácido 5-(fenilazo)-6-hidroxinaftaleno-2-sulfônico, em peles de rato, porco e humanos. Assim, avaliações do risco dérmico à exposição aos azo corantes também deveriam ser consideradas (COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993; ZBAIDA, 2002).

Desse modo, a redução dos azo corantes pode produzir compostos que são mais ou menos tóxicos que a molécula original, e com isso a azorredução pode diminuir ou aumentar algum efeito tóxico ou carcinogênico dos corantes. Por exemplo, foi demonstrada que a redução inicial dos azo corantes baseados em benzidina foi resultante da atividade da azorredutase pela flora intestinal. Assim, foi feito um estudo dos metabólitos oriundos do corante Direct Black 38 e os seguintes produtos foram identificados: benzidina, 4-aminobifenil, monoacetilbenzidina e acetilaminobifenil. Adicionalmente, foi realizado o teste de mutagenicidade em *Salmonella*/microsoma e estes metabólitos apresentaram resultados positivos na presença de S9 (COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982; CHUNG, 1983; CERNIGLIA et al., 1986).

Alguns azo corantes, tais como Brown FK, são diretamente mutagênicos em testes bacterianos (HAVELAND-SMITH; COMBES, 1980a,b; RAFFI; HALL;

CERNIGLIA, 1997). Entretanto, outros corantes, tais como Congo Red, Direct Black 38 e Red N°. 9, apresentaram resultados positivos para mutagenicidade somente após a redução química, incubação com extrato cecal de roedor ou incubação com conteúdo do trato intestinal (GARNER; NUTMAN, 1977; HAVELAND-SMITH; COMBES, 1980a,b; REID et al., 1983; CERNIGLIA et al., 1986; CHUNG; CERNIGLIA, 1992; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997).

Foram feitas as análises pelo CLAE/DAD e pelo CG/EM dos produtos obtidos após a redução dos corantes em estudo, e os compostos identificados por CLAE/DAD foram: Disperse Red 1 e Disperse Red 13 geraram apenas Sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, na proporção de 9% e 6%, respectivamente; e após a redução química do corante Disperse Orange 1 foi formada a benzamina a 90%. Na análise por CG/EM, os compostos 4-nitro-benzamina e 2-(etilfenilamino)-etanol foram identificados como produtos da redução dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13, enquanto que 2-cloro-4-nitro-benzamina foi identificada apenas após a redução do corante Disperse Red 13, e por fim, os produtos benzamina, nitrobenzeno, N-fenil-benzamina e N-fenil-1,4-benzenodiamina foram obtidos após a redução química do Disperse Orange 1. É importante destacar que a benzamina foi o único composto que foi encontrado tanto pela análise por CLAE/DAD como pelo CG/EM após a redução química do corante Disperse Orange 1.

Além dos processos químicos de oxidação e redução, também foi promovida a reação dos corantes em estudo com o S9, que é um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com Aroclor-1254, pois o metabolismo hepático de azo corantes, particularmente amino azo corantes carcinogênicos, tem recebido grande atenção pela comunidade científica, como foi o trabalho de Shargel e Mazel que mostraram a importância da indução do citocromo P450 nas azorredutases microsomal hepática (SHARGEL; MAZEL, 1972; CHUNG; STEVENS; CERNIGLIA, 1992). Daí a necessidade de se fazer estes testes com S9, pois mimetizam o processo oxidativo envolvendo o sistema citocromo P450. Assim, as substâncias que exercem sua atividade mutagênica após metabolização via citocromo P450, poderão ser geradas pela adição de S9 (AMES; McCANN; YAMASAKI, 1975; MARON; AMES, 1983; JARVIS et al., 1996).

Considerando as reações com S9, os corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 foram metabolizados após 1 hora e trinta minutos de

incubação com S9, e os produtos identificados pelo CLAE/DAD foram: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada oriundo da reação com o corante Disperse Red 1; 2-cloro-4-nitro-benzamina proveniente do corante Disperse Red 13 e benzamina foi formada após a reação com corante Disperse Orange 1. Pode-se observar que esses produtos formados coincidiram com aqueles encontrados após a oxidação química.

Garrigós e colaboradores (2002) realizaram um estudo para determinação de aminas aromáticas formadas após a redução de azo corantes utilizados principalmente em brinquedos, e dentre esses corantes utilizados no estudo supracitado estão o Disperse Red 1 e Disperse Red 13. Ditionito de sódio foi utilizado na clivagem redutiva do grupo azo dos corantes e as aminas liberadas foram posteriormente analisadas pela CLAE com detecção ultravioleta. Os produtos de redução identificados a partir do Disperse Red 1 foram: em experimentos a baixa temperatura e proporção ditionito/corante, 4-nitroanilina (ou seja, 4-nitro-benzamina) foi encontrada, mas em condições mais elevadas, apareceu 1,4- diaminobenzeno. Enquanto que após a redução do corante Disperse Red 13 foi identificado apenas 2-cloro-1,4-diaminobenzeno (GARRIGÓS et al., 2002). Pode-se observar que os produtos de redução identificados por Garrigós et al. (2002) coincidiram parcialmente com os apresentados por este trabalho: nos dois estudos o composto 4-nitro-benzamina foi encontrado após a redução do corante Disperse Red 1. Vale lembrar que as condições de redução às quais os corantes foram submetidos também foram distintas.

Dentre todos os compostos identificados no presente trabalho como produtos de metabolização dos corantes, os de maior interesse toxicológico são nitrobenzeno, benzamina e 2-cloro-4-nitro-benzamina. O nitrobenzeno, identificado como produto de oxidação do corante Disperse Red 1 e como produto de oxidação e redução do corante Disperse Orange 1, é um composto metemoglobinizante e suspeito carcinogênico (BHATKHANDE, PANGARKAR, BEENACKERS, 2003; LEPERA, 2008).

Em relação à benzamina, usualmente conhecida como anilina, estudos mostraram que este composto é capaz de induzir, preferencialmente, um raro espectro de tumores no baço de ratos Fisher 344 (BOMHARD; HERBOLD, 2005). Exposições crônicas a esse composto em ratos também conduzem a variadas respostas tóxicas no baço, as quais são caracterizadas por esplenomegalia,

atividade eritropoiética aumentada, hiperpigmentação, hiperplasia, fibroses e uma variedade de sarcomas primários nesse órgão (KHAN; KANNAN; WANG, 2006; MA et al., 2008). A genotoxicidade da benzamina tem sido investigada em muitos estudos incluindo um considerável número de experimentos *in vivo*. Várias pesquisas em ratos e camundongos mostraram potencial clastogênico em doses orais elevadas (ASHBY; VLACHOS; TINWELP, 1991; RESS et al., 2002; BOMHARD; HERBOLD, 2005). Enquanto que nos ratos o aumento no número de micronúcleos na medula óssea foi acompanhado por um aumento nas aberrações cromossômicas (BOMHARD, 2003), em camundongos essa alteração não foi observada (JONES; FOX, 2003).

É importante destacar que muitas benzaminas são utilizadas na produção dos azo corantes, e estas são liberadas através da azorredução que ocorre pelos microorganismos intestinais e ambientais (CHUNG; CERNIGLIA, 1992; CHUNG; STEVENS; CERNIGLIA, 1992). Algumas destas benzaminas possuem atividades carcinogênicas e mutagênicas e podem se acumular na cadeia alimentar (CREBELLI et al., 1981; WATANABE; HIRAYAMA; FUKUI, 1990; CHUNG et al., 1997).

As nitrobenzaminas (também conhecidas como nitroanilinas) são aminas aromáticas, que são comumente geradas durante a biodegradação de azo corantes sob condições anaeróbicas, formadas pela clivagem redutiva das ligações azo ($-N=N-$) pela ação de microorganismos presentes nas águas residuais (PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004; VAN DER ZEE; VILLAYERDE, 2005; KHALID; ARSHAD; CROWLEY, 2009). Dependendo dos compostos individuais, muitos metabólitos das aminas aromáticas são considerados não-biodegradáveis, ou muito lentamente degradáveis (SAUPE, 1999), mostrando uma grande variedade de efeitos tóxicos sobre a vida aquática e organismos superiores (WEISBURGER, 2002; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004; KHALID; ARSHAD; CROWLEY, 2009). De acordo com Cottalasso et al. (1991) a 2-cloro-4-nitro-benzamina induz à morte celular de hepatócitos de ratos isolados após 1-3 horas de exposição a 0,2 e 2 mM deste xenobiótico, além de produzir dano microssomal. Outros estudos realizados mostraram que o composto 2-cloro-4-nitro-benzamina apresentou potencial mutagênico ao ser testado pelo Ensaio *Salmonella typhimurium* com as linhagens TA98NR, YG1020, YG1021 YG1024 (ESPINOSA-AGUIRRE, REYES, CORTINAS de NAVA, 1991) e provoca falha no sistema de reparo de DNA

(YOSHIMI et al., 1988). Pela análise no CG/EM, foram também identificadas as seguintes benzaminas: 4-nitro-benzamina após a oxidação do corante Disperse Red 1 e depois da redução dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13, e N-fenil-benzamina após a redução e oxidação do corante Disperse Orange 1. No entanto, não foi encontrado na literatura nenhum dado a cerca do potencial mutagênico ou carcinogênico dessas substâncias químicas.

Portanto, alguns dos compostos identificados neste trabalho provenientes da oxidação e redução dos azo corantes estudados já são conhecidos por apresentarem potenciais mutagênicos. Assim, pode-se dizer que tanto os corantes originais como seus produtos de degradação são prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente.

Vale salientar que os resultados e as discussões do ensaio MLA e do teste *Salmonella*/microsoma para o corante Disperse Red 1 e seus produtos de biotransformação, juntamente com os resultados obtidos a partir do CLAE/DAD e CG/EM, foram submetidos ao periódico *Toxicology in vitro*. O manuscrito já foi avaliado e apenas pequenas alterações foram sugeridas por um dos assessores, sendo que o segundo revisor considerou o artigo aceito sem necessidade de correção.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A formação de adutos com o DNA, especificamente com a base guanosina, não é o mecanismo de ação tóxica preferencial para os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1;
- O corante Disperse Red 1 e seus produtos de biotransformação apresentaram resultados negativos no teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongos;
- Tanto os produtos de oxidação como os de redução dos três corantes estudados apresentaram potencial mutagênico ao serem testados no Ensaio *Salmonella*/microsoma;
- Espectrofotometria na região UV-visível e Eletrólise a Potencial Controlado são duas técnicas capazes de promover a oxidação e a redução dos azo corantes em estudo;
- Após a oxidação química do corante Disperse Red 1 foram formados os seguintes produtos: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, nitrobenzeno e 4-nitro-benzamina; já a oxidação química do corante Disperse Red 13 gerou: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada e 2-cloro-4-nitro-benzamina; e, por fim, benzamina, nitrobenzeno, N-fenil-benzamina e N-fenil-1,4 benzenodiamina são compostos provenientes da oxidação química do corante Disperse Orange 1;
- Após a redução química do corante Disperse Red 1 formou-se os seguintes produtos: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, 4-nitro-benzamina e 2-(etilfenilamino)-etanol; da redução química do corante Disperse Red 13 formaram-se: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, 4-nitro-benzamina, 2-(etilfenilamino)-etanol e 2-cloro-4-nitro-benzamina; enquanto que benzamina, nitrobenzeno, N-fenil-benzamina e N-fenil-1,4-benzenodiamina foram os compostos oriundos da redução química do corante Disperse Orange 1;

- Esses azo corantes originais em contato com S9 sofrem oxidação e formam novos produtos, sendo que sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada é produto oriundo do corante Disperse Red 1; 2-cloro-4-nitro-benzamina, do corante Disperse Red 13 e benzamina proveniente do corante Disperse Orange 1;
- Alguns dos produtos de oxidação e redução desses azo corantes são conhecidos por apresentarem potencial mutagênico e, portanto, esses azo corantes representam uma grande ameaça tanto ao ser humano como ao meio ambiente, não somente na forma original, como já demonstrado por nosso grupo, mas também após os processos de biotransformação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AL-SABTI, K. Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 47, n. 2, p.149-155, 2000.

AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 6, p. 347-364, 1975.

ANLIKER, R. Ecotoxicology of dyestuffs - a joint effort by industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 3, n. 1, p. 59-74, 1979.

ARLT, V.M.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PABEL, U.; SORG, B.L.; SCHMEISER, H.H.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of the environmental contaminant 3 nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1937-1945, 2002.

ASHBY, J.; TENNANT, R. W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 257, n. 3, p. 229-306, 1991.

ASHBY, J.; VLACHOS, D.A.; TINWELL, H. Activity of aniline in the mouse bone marrow micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 263, n. 2, p. 115-117, 1991.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). **Definição**. Brasília. Disponível em: < <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>>. Acesso em: 16 Ago. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). **História**. Brasília. Disponível em: < http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp>. Acesso em: 16 Ago. 2006.

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

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

---

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

BENOIT, F.; HOLMES, J.L. The mechanism of NO loss from the molecular ion of nitrobenzene and the fragmentation behaviour of the phenoxy and *p*-aminophenoxy cations. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, London, n. 16, p. 1031-1032, 1970

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., MCCANN, J., PIKE, M.C.. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.97, n. 4, p.267-281, 1982.

BHATKHANDE, D.S.; PANGARKAR, V.G.; BEENACKERS, A.A.C.M. Photocatalytic degradation of nitrobenzene using titanium dioxide and concentrated solar radiation: chemical effects and scaleup. **Water Research**, Oxford, v. 37, n. 6, p.1223-1230, 2003.

BONSER, G.M.; CLAYSON, D.B.; JULL, J.W. The potency of 20-methylcholanthrene relative to other carcinogens on bladder implantation. **British Journal of Cancer**, London, v.17, n. 2, p.235-241, 1963.

BOMHARD, E.M. High-dose clastogenic activity of aniline in the rat bone marrow and its relationship to the carcinogenicity in the spleen of rats. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 77, n. 5, p. 291-297, 2003.

BOMHARD, E.M.; HERBOLD, B.A. Review: Genotoxic activities of aniline and its metabolites and their relationship to the carcinogenicity of aniline in the spleen of rats. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 35, n. 10, p. 783-835, 2005.

BROWN, J.P.; ROEHM, G.W.; BROWN, R.J. Mutagenicity testing of certified food colours and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the Salmonella/microsome system. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 249-271, 1978 (Abstract).

CAMERON, T.P.; HUGHES, T.J.; KIRBY, P.E.; PALMER, K.A.; FUNG, V.A.; DUNKEL, V.C. Mutagenic activity of 5 thiazole compounds in the Salmonella/microsome and mouse lymphoma TK [±] assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 155, n. 1-2, p. 17-25, 1985.

CAMERON, T.P.; HUGHES, T.J.; KIRBY, P.E.; FUNG, V.A.; DUNKEL, V.C. Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella/microsome and mouse lymphoma TK [±] assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 189, n. 5, p. 223-261, 1987.

CARLIELL, C.M.; BARCLAY S.J.; NAIDOO N.; BUCKLEY C.A.; MULHOLLAND, D.A.; SENIOR, E. (1995). Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water SA**, Gezina, v. 21, n. 1, p. 61-69, 1995.

CERNIGLIA, C.E.; FREEMAN, J.P.; FRANKLIN, W.; PACK, L.D. Metabolism of benzidine and benzidinecongener based dyes by human, monkey and rat intestinal bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 107, n. 4, p. 1224-1229, 1982.

CERNIGLIA, C.E.; ZHUO, Z.; MANNING, B.W.; FEDERLE, T.W.; HEFLICH, R.H. Mutagenic activation of the benzidine-based dye Direct Black 38 by human intestinal microflora. **Mutation Research**, Amsterdam, v.175, n. 1, p. 11-16, 1986.

CHADWICK, R.W.; GEORGE, S.E.; CLAXTON, L.D. Role of the gastrointestinal mucosa and microflora in the bioactivation of dietary and environmental mutagens or carcinogens. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 24, n. 4, p. 425-492, 1992.

CHANG, J.S.; CHIEN CHOU, C.; YU-CHIH LIN, Y.C.; PING-JEI LIN, P.J.; JIN-YEN HO, J.Y.; HU, T.L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Research**, New York, v. 35, n. 12, p. 2841-2850, 2001.

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

CHEQUER, F.M.D.; ANGELI, J.P.F.; FERRAZ, E.R.A.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA, D.P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 676, n. 1-2, p. 83-86, 2009. Errata em: **Mutation Research**, Amsterdam, v. 702, n. 1, p. 129, 2010.

CHOUDHARY, G. Human health perspectives on environmental exposure to benzidine: a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 267-291, 1996.

CHUNG, K.T.; FULK, G.E.; ANDREWS, A.W. The mutagenicity of methyl orange and metabolites produced by intestinal anaerobes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 58, n. 2-3, p. 375-379, 1978.

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

CHUNG, K.T.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutation Research**, Amsterdam, v.277, n. 3, p.201-220, 1992.

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

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Houston, v. 12, n. 11, p. 2121-2132, 1993.

CHUNG, K.T.; CHEN, S.C.; ZHU, Y.Y.; WONG, T.Y.; STEVENS, S.E. Toxic effects of some benzamines on the growth of *Azotobacter vinelandii* and other bacteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Houston, v. 16, n. 7, p. 1366-1369, 1997.

CHUNG, K.T.; HUGHES, T.J.; CLAXTON, L.D. Comparison of the mutagenic specificity induced by four nitro-group-containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium* his genes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 465, n. 1-2, p. 165-171, 2000.

CLEMENTS, J. The Mouse Lymphoma Assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 97-110, 2000.

CLIVE, D.; FLAMM, W.G.; MACHESKO, M.R.; BERNHEIM, N.J. A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 77-87, 1972.

CLIVE, D.; SPECTOR, J.F.S. Laboratory procedure for assessing specific locus mutation at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 17-29, 1975.

CLIVE, D.; JOHNSON, K.O.; SPECTOR, J.F.S.; BATSON, A.G.; BROWN, M.M.M. Validation and characterization of the L5178Y/TK^{+/+} mouse lymphoma mutagen assay system. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 61-108, 1979.

COLLIER, S.W.; STORM, J.E.; BRONAUGH, R.L. Reduction of azo dyes during *in vitro* percutaneous absorption. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 118, n. 1, p. 73-79, 1993.

COMBES, R.D.; HAVELAND-SMITH, R.B. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 101-248, 1982.

COTTALASSO, D.; PRONZATO, M.A.; DOMENICOTTI, C.; BARISONE, G., FONTANA, L., NANNI, G. Toxicity of 4-chloro-2-nitroaniline and 2-chloro-4-nitroaniline to isolated rat hepatocytes. **La Medicina del lavoro**, Fidenza, v. 82, n. 3, p. 253-260, 1991.

CREBELLI, R.; CONTI, L.; CARERE, A.; ZITO, R. Mutagenicity of commercial *p*-phenylenediamine and of an oxidation mixture of *p*-phenylenediamine and resorcinol in *Salmonella typhimurium* TA98. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 79-84, 1981.

DENISOV, I.G.; MAKRIS, T.M.; SLIGAR, S.G.; SCHLICHTING, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. **Chemical Reviews**, Washington, v. 105, n. 6, p. 2253-2277, 2005.

DIPPLE, A.; MICHEJDA, C.J.; WEISBURGER, E.K. Metabolism of chemical carcinogens. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 265-296, 1985.

DOERR, C.L.; HARRINGTON-BROCK, K.; MOORE, M.M. Micronucleus, chromosome aberration, and small-colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 222, n. 3, p. 191-203, 1989.

ESANCY, J.F.; FREEMAN, H.S.; CLAXTON, L.D. The effect of alkoxy substituents on the mutagenicity of some aminoazobenzene dyes and their reductive-cleavage products. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 1-22, 1990.

ESPINOSA-AGUIRRE, J.J.; REYES, R.E.; CORTINAS de NAVA, C. C. Mutagenic activity of 2-chloro-4-nitroaniline and 5-chlorosalicylic acid in *Salmonella typhimurium*: two possible metabolites of niclosamide. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 264, p. 139-145, 1991.

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

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**, New York, p. 1-9, 2010. In press.

FIELD, F.E.; ROBERTS, G.; HALLOWES, R.C.; PALMER, A.K.; KENNETH E. WILLIAMS, K.E.; LLOYD, J.B. Trypan blue: identification and teratogenic and oncogenic activities of its coloured constituents. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 69-88, 1977.

FOLK, T.L.; WIDEMAN, L.G. Competing Fragmentations in the Mass Spectra of Halogenated Phenols. **Chemical Communications**, Cambridge, n. 9, p. 491-492, 1969.

FORSS, J.; WELANDER, U. Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.65, n. 1, p. 227-237, 2011.

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**, Oxford, v. 24, n. 2, p.165-169, 1986.

FREEMAN, H.S.; ESANCY, J.F.; CLAXTON, L.D. An approach to the design of non mutagenic azo dyes: analogs of the mutagen CI Direct Black 17. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 13, n. 1, p. 5-77, 1990.

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

GARG, A.; BHAT, K.L.; BOCK, C.W. Mutagenicity of aminoazobenzene dyes and related structures: a QSAR/QPAR investigation. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 55, n. 1, p. 35-52, 2002.

GARNER, R.C.; NUTMAN, C.A. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. **Mutation Research**, v. 44, n. 1, p. 9-19, 1977.

GARRIGÓS, M.C.; RECHE, F.; MARÍN, M.L.; JIMÉNEZ, A. Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 976, n. 1-2, p. 309-317, 2002.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z.W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 203-210, 2004.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Textile dyes. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

HAGIWARA, Y.; WATANABE, M.; ODA, Y.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 291, n. 3, p. 171-180, 1993.

HARRINGTON-BROCK, K.; COLLARD, D.D.; CHEN, T. Bromate induces loss of heterozygosity in the *Thymidine kinase* gene of L5178Y/*Tk*^{+/-}-3.7.2C mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 21-28, 2003.

HARTMAN, C.P.; FULK, G.E.; ANDREWS, A.W. Azo reduction of trypan blue to a known carcinogen by a cell-free extract of a human intestinal anaerobe. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 58, n. 2-3, p. 125-132, 1978.

HASHIMOTO, Y.; WATANABE, H.; DEGAWA, M. Mutagenicity of methoxyl derivatives of N-hydroxy-4-amino-azobenzenes and 4-nitroazobenzene. **Gann**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 373-374, 1977.

HAVELAND-SMITH, R.B.; COMBES, R. D. Screening of food dyes for genotoxic activity. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 215-221, 1980a.

HAVELAND-SMITH, R.B.; COMBES, R.D. Genotoxicity of the food colours Red 2G and Brown FK in bacterial systems: use of structurally-related dyes and azo-reduction. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 223-228, 1980b.

HONMA, M.; HAYASHI, M. ; SHIMADA, H.; TANAKA, N.; WAKURI, S.; AWOGI, T.; YAMAMOTO, K.I.; KODANI, N.; NISHI, Y. ; NAKADATE, M. ; SOFUNI, T. Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test. **Mutagenesis**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 5-22, 1999.

HOZIER, J.; SAWYER, J.; A, CLIVE, D.; MOORE, M. Cytogenetic distinction between the TK⁺ and TK⁻ chromosomes in the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C mouse-lymphoma cell line. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 105, n. 6, p. 451-456, 1982.

HOZIER, J.; SAWYER, J.; CLIVE, D.; MOORE, M.M. Chromosome 11 aberrations in small colony L5178Y TK^{-/-} mutants early in their clonal history. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 5, p. 237-242, 1985.

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

JÄGER, I.; HAFNER, C.; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 561, n. 1-2, 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**, New York, v. 33, n. 2, p. 193-200, 1996.

JIN, X.C.; LIU, G.Q.; XU, Z.H.; TAO, W.Y. Decolourisation of a Dye Industry Effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 239-243, 2007.

JONES, E.; FOX, V. Lack of clastogenic activity of aniline hydrochloride in the mouse bone marrow. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 283-286, 2003.

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, n. 18, p. 4019-4027, 2004.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; CROWLEY, D.E. Biodegradation potential of pure and mixed bacterial cultures for removal of 4-nitroaniline from textile dye wastewater. **Water Research**, New York, v. 43, n. 4, p. 1110-1116, 2009.

KHAN, M.F.; KANNAN, S.; WANG, J. Activation of transcription factor AP-1 and mitogen-activated protein kinases in aniline-induced splenic toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 210, n. 1-2, p. 86-93, 2006.

KLEINOW, K.M.; MELANCON, M.J.; LECH, J.J. Biotransformation and Induction: Implications for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 71, p. 105-119, 1987.

KRIŽANEC, B.; MARECHAL, A.M.L. Dioxins and dioxin-like persistent organic pollutants in textiles and chemicals in the textile sector. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 79, p.177-186, 2006.

KUČEROVÁ, M.; POLIVKOWI, Z.; GREGOR, V.; DOLANSKÁ, M.; MÁLEK, B.; KLIMENT, V.; ŽDÁRSKÝ, E.; MAROUŠKOVÁ, A.; NOVÁKOVÁ, J. The possible mutagenic effect of the occupation of TV announcer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 192, n. 1, p. 59-63, 1987.

KUSIC, H.; JURETIC, D.; KOPRIVANAC, N.; MARIN, V.; BOŽIĆ, A.L. Photooxidation processes for an azo dye in aqueous media: Modeling of degradation kinetic and ecological parameters evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, n. 2-3, p. 1558-1568, 2011.

LEPERA, J.S. Agentes Metemoglobinizantes in: **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2008, cap. 3.2, p. 261-274, ed. Terceira

LIMA, P.L.A.; RIBEIRO, L.R. Teste de mutação gênica em células de mamífero (*mouse lymphoma assay*) in: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora ULBRA, 2003, cap. 5, p. 113-150, ed. primeira.

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**, Amsterdam, v. 626, n. 1-2, p. 53-60, 2007.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.

LIZIER, T.M. **Ocorrência de Aminas Aromáticas como subprodutos da degradação dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9**: UNESP, 2009. 201 páginas. Dissertação (mestrado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

MA, H.; WANG, J.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; BOOR, P.J.; KHAN, M.F. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 233, n. 2, p. 247-253, 2008.

MAAS, R.; CHAUDHARI, S. Adsorption and biological decolorization of azo dye reactive red 2 in semicontinuous anaerobic reactors. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 699-705, 2005.

MANSOUR, H.B.; CORROLER, D.; BARILLIER, D.; GHEDIRA, K.; CHEKIR, L.; MOSRATI, R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 9, p.1670-1677, 2007.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v. 10, n. 4-5, p. 392-413, 2007.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 173-214, 1983.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

McCLAIN, R.M.; WOLZ, E.; DAVIDOVICH, A.; BAUSCH, J. Genetic toxicity studies with genistein. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 42-55, 2006.

McLAFFERTY, F.W.; TURECEK, F. Interpretation of massa spectra. 4a. Ed. University Science Books: EUA, 1993, p.371.

MOORE, M.M.; COLLARD, D.D.; HARRINGTON-BROCK, K. Failure to adequately use positive control data leads to poor quality mouse lymphoma data assessments. **Mutagenesis**, Oxford, v.14, n. 3, p. 261-263, 1999.

MOORE, M.M.; HONMA, M.; CLEMENTS, J.; BOLCSFOLDI, G.; CIFONE, M.; DELONGCHAMP, R.; FELLOWS, M.; GOLLAPUDI, B.; JENKINSON, P.; KIRBY, P.; KIRCHNER, S.; MUSTER, W.; MYHRE, B.; O'DONOVAN, M.; OLIVER, J.; OMORI, T.; OULDELHKIMM, M.C.; PANT, K.; PRESTON, R.; RIACH, C.; SAN, R.; STANKOWSKI, L.F.; E, THAKUR, A.; WAKURI, S.; YOSHIMURA, I. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup Report—Plymouth, UK 2002. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 540, n. 2, p. 127-140, 2003.

MOORE, M.M.; HONMA, M.; CLEMENTS, J.; BOLCSFOLDI, G.; BURLINSON, B.; CIFONE, M.; CLARKE, J.; DELONGCHAMP, R.; DURWARD, R.; FELLOWS, M.; GOLLAPUDI, B.; HOU, S.; JENKINSON, P.; LLOYD, M.; MAJESKA, J.; MYHR, B.; O'DONOVAN, M.; OMORI, T.; RIACH, C.; SAN, R.; STANKOWSKI, L.F. JR.; THAKUR, A.K.; VAN GOETHEM, F.; WAKURI, S.; YOSHIMURA, I. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing--Aberdeen, Scotland, 2003--Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 47, n. 1, p. 1-5, 2006.

MOORE-BROWN, M.M.; CLIVE, D.; HOWARD, B.E.; BATSON, A.G.; JOHNSON, K.O. The utilization of trifluorothymidine (TFT) to select for thymidine kinase-deficient (TK^{-/-}) mutants from L5178Y/TK^{+/-} mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 85, n. 5, p. 363-378, 1981.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

NAM, S.; RENGANATHAN, V. Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH, **Chemosphere**, Oxford, v. 40, n. 4, p.351-357, 2000.

NESTMANN, E.R.; KOWBEL, D.J.; WHEAT, J.A. Mutagenicity in *Salmonella* of dyes used by defence personnel for the detection of liquid chemical warfare agents. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 2, n. 9, p. 879-883, 1981.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent—Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 626, n. 1-2, p. 135-142, 2007.

OSUGI, M.E.; RAJESHWAR, K.; FERRAZ, E.R.A.; OLIVEIRA, D.P.; ARAÚJO, A.R.; ZANONI, M.V.B. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photoelectrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. **Electrochimica Acta**, Amsterdam, v. 54, n. 7, p. 2086-2093, 2009.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Review: Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 59, n. 2, p. 73-84, 2007.

PERCY, A.J.; MOORE, N.; CHIPMAN, J.K. Formation of nuclear anomalies in rat intestine by benzidine and its biliary metabolites. **Toxicology**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 217-223, 1989.

PHILLIPSON, C.E.; IOANNIDES, C. Activation of aromatic amines to mutagens by various animal species including man. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 325-336, 1983.

PIELESZ, A. The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 511-512, n. 23, p. 337-344, 1999.

PIELESZ, A.; BARANOWSKA, I.; RYBAK, A.; WŁOCHOWICZ, A. Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 53, n. 1, p. 42-47, 2002.

PINTO, L.F.R.; I. FELZENSZWALB, I. in: Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds.), *Mutagênese Ambiental*, Editora da ULBRA, 2003, cap. 2.

PINHEIRO, H.M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 61, n. 2, p. 121-139, 2004.

PRIVAL, M.J.; MITCHELL, V.D. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 103-116, 1982.

RAFII, F.; HALL, J. D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 897-901, 1997.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON M.A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 444, n. 1, p. 175-180, 1999.

REID, T. M.; MORTON, K. C.; WANG, C. Y.; KING C. M. Conversion of Congo red and 2-azoxyfluorene to mutagens following *in vitro* reduction by whole-cell rat cecal bacteria. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 117, p. 105-112, 1983.

RESS, N.B.; WITT, K.L.; XUC, J.; HASEMANA, J.K.; BUCHER, J.R. Micronucleus induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 521, n. 1-2, p. 201-208, 2002.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.

SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S. & GOVINDWAR, S.P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138-157, 2011.

SAUPE, A. High-rate biodegradation of 3- And 4-Nitroaniline. **Chemosphere**, Oxford, v. 39, n. 13, p. 2325-2346, 1999.

SAWYER, J.; MOORE, M.M.; CLIVE, D.; HOZIER, J. Cytogenetic characterization of the L5178Y TK ⁺/₋ 3.7.2C mouse lymphoma cell line. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 5, p. 243-253, 1985.

SEESURIYACHAN, P.; TAKENAKA, S.; KUNTIYA, A.; KLAYRAUNG, S.; MURAKAMI, S.; AOKI, K. Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. **Water research**, New York, v. 41, n. 5, p. 985-992, 2007.

SHARGEL, L.; MAZEL, P. Influence of 2,4-dichloro-6-phenoxyethyl-amine (DPEA) and -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate (SKF-525A) on hepatic microsomal azoreductase activity from phenobarbital or 3-methylcholanthrene induced rats. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 69-75, 1972.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, Oxford, v. 22, n.1-2, p. 107-119, 1991.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Espectrometria de massas in: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, cap. 2, p. 3-36, ed. Quinta.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGÊNESE E TERATOGENESE AMBIENTAL (SBMCTA). São Paulo, 2004. UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F.; FELZENSZWALB, I.; HENRIQUERS, J.A.P.; VARANDA, E. **Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente**. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma). (Série de Documentos, 1). Disponível em <<http://www.sbmcta.org.br>>. Acesso em: 20 Out. 2010.

SOFUNI, T.; WILCOX, P.; SHIMADA, H.; CLEMENTS, J.; HONMA, M.; CLIVE, D.; GREEN, M.; THYBAUD, V.; SAN, R.H.; ELLIOTT, B.M.; MÜLLER, L. Mouse lymphoma workshop: Victoria, British Columbia, Canada, March 27, 1996 protocol issues regarding the use of the Microwell Method of the Mouse Lymphoma Assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 29, n. 4, p. 434-438, 1997.

SORIANO, C.; CREUS, A.; MARCOS, R. Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, p. 40-50, 2007.

STAHLMANN, R.; WEGNER, M.; RIECKE, K.; KRUSE, M.; PLATZEK, T. Sensitising potential of four textile dyes and some of their metabolites in a modified local lymph node assay. **Toxicology**, Amsterdam, v. 219, n. 1-3, p. 113-123, 2006.

SWEENEY, E.A.; CHIPMAN, J.K.; FORSYTHE, S.J. Evidence for Direct-acting Oxidative Genotoxicity by Reduction Products of Azo Dyes. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle, v. 102, n. 6, p. 119-122, 1994.

TÁRRAGA, C.S. **Utilidad del ensayo de linfoma de ratón em La determinación de los mecanismos de genotoxicidad Del arsênico. Espectro mutacional del trióxido de arsênico**: UAB, 2009. 170 páginas. Tese de doutorado. Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona – Espanha, 2009.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 21, n. 8, p. 1650-1655, 2007.

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.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H.; OLIVEIRA, D.P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 55-64, 2005a.

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**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 49-56, 2005b.

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

VENTURINI, S.; TAMARO, M. Mutagenicity of anthraquinone and azo dyes in Ames' *Salmonella typhimurium* test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 307-312, 1979.

WATANABE, T.; HIRAYAMA, T.; FUKUI, S. The mutagenic modulating effect of *p*-phenylenediamine on the oxidation of *o*- or *m*-phenylenediamine with hydrogen peroxide in the *Salmonella* test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 245, n. 1, p. 15-22, 1990.

WALPOLE, A.L.; WILLIAMS, M.H.C. Aromatic amines as carcinogens in industry. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 14, p. 141-145, 1958.

WALKER, R. The Metabolism of Azo Compounds: A Review of the Literature. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 659-676, 1970.

WALKER, R.; RYAN, A.J. Some molecular parameters influencing rate of reduction of azo compounds by intestinal microflora. **Xenobiotica**, London, v. 1, n. 4-5, p. 483-486, 1971.

WATABE, T.; OZAWA, N.; KOBAYASHI, F.; KURUTA, H. Reduction of sulphonated water-soluble azo dyes by micro-organisms from human faeces. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.18, n. 4, p. 349-352, 1980.

WEISBURGER, J.H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 506–507, p. 9-20, 2002.

YOSHIMI, N.; SUGIE, S.; IWATA, H.; NIWA, K.; MORI, H.; HASHIDA, C.; SHIMIZU, H. The genotoxicity of a variety of aniline derivatives in a DNA repair test with primary cultured rat hepatocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 206, n. 2, p. 183-191, 1988.

ZBAIDA, S.; STODDART, A.M.; LEVINE, W.G. Studies on the mechanism of reduction of azo dye carcinogens by rat liver microsomal cytochrome P-450. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 61-71, 1989.

ZBAIDA, S. The mechanism of microsomal azoreduction-predictions based on electronic aspects of structure-activity-relationships. **Drug Metabolism Reviews**, London, v. 27, p. 497-516, 1995.

ZBAIDA, S. Nitroreductases and Azoreductases in: **Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics**, Guildford-UK: John Wiley & Sons Ltd, 2002, cap. 16, p. 555-566.

ZEIGER, E.; HASEMAN, J.K.; SHELBY, M.D.; MARGOLIN, B.H.; TENNANT, R.W. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 16, n. 18, p. 1-14, 1990.

ZOLLINGER, H. Colour Chemistry: Synthesis, Properties of Organic Dyes and Pigments. New York: VCH, 1987, p. 92.

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

APÊNDICES

Apêndice A

Dados brutos dos experimentos com os produtos de oxidação dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 utilizando o Teste de Ames

TABELA 1. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem TA98, na ausência 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	5,05
		33	24		
0,1	19	31	38	29,33	9,61
0,5	35	42	42	39,67	4,04
1	71	73	71	71,67	1,15
5	112	136	132	126,67	12,86
10	292	297	265	284,67	17,21
50	996	1022	1075	1.031,00	40,26
100	1534	1578	1628	1.580,00	47,03
200	2036	1923	952	1.979,50	79,90
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	560		545,00	21,21
		530			

TABELA 2. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	59	61	51	51,40	8,56
		42	44		
0,01	52	46	---	49,00	4,24
0,05	50	61	59	56,67	6,27
0,1	57	72	68	65,67	7,88
0,5	166	126	138	143,33	44,75
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	599		663,50	91,22
		728			

TABELA 3. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem TA98, na ausência 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	5,05
		33	24		
5	35	39	26	33,33	6,66
10	31	39	34	34,67	4,98
50	77	62	75	71,33	20,89
100	106	152	120	126,00	33,84
200	214	249	210	224,33	57,51
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)		560	545,00	21,21
			530		

TABELA 4. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem YG1041, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	59	61	51	51,40	8,56
		42	44		
0,5	68	50	57	58,33	9,07
1	67	68	75	70,00	9,02
5	123	117	110	116,67	26,04
10	160	172	162	164,67	26,92
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	599		663,50	91,22
		728			

TABELA 5. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem TA98, na ausência 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	5,05
		33	24		
5	35	30	***	32,50	3,54
10	42	29	30	33,67	5,45
50	86	93	100	93,00	33,12
100	186	170	164	173,33	44,80
200	248	256	265	256,33	46,34
			560		
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)			545,00	21,21
			530		

TABELA 6. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de oxidação do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	59	61	51	51,40	8,56
		42	44		
0,05	79	61	69	69,67	9,02
0,1	81	65	89	78,33	10,71
0,5	104	112	106	107,33	17,86
1,0	144	139	155	146,00	21,96
5,0	283	276	300	286,33	77,43
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	599		663,50	91,22
		728			

Apêndice B

**Dados brutos dos experimentos com os produtos de
redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e
Disperse Orange 1 utilizando o Teste de Ames**

TABELA 7. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem TA98, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	25	21	25	24,40	1,95
		25	26		
0,1	21	28	28	25,67	4,04
0,5	41	36	23	33,33	7,66
1	51	46	43	46,67	9,72
5	98	84	92	91,33	25,00
10	190	137	158	161,67	42,29
50	524	552	493	523,00	199,50
100	764	796	724	761,33	133,83
200	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)		400	390,00	14,14
			380		

TABELA 8. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Red 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	52	56	58	56,80	4,09
		55	63		
0,01	41	37	44	39,00	3,51
0,05	44	59	47	50,00	7,50
0,1	55	52	51	52,67	5,39
0,5	98	121	102	107,00	30,79
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	950		960,00	14,14
		970			

TABELA 9. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem TA98, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	25	21	25	24,40	1,95
		25	26		
5	22	27	22	23,67	2,89
10	34	25	27	28,67	4,45
50	38	52	50	46,67	11,36
100	80	90	89	86,33	22,52
200	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)			390,00	14,14
			400 380		

TABELA 10. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Red 13, empregando a linhagem YG1041, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	52	56	58	56,80	4,09
		55	63		
0,5	55	49	58	54,00	4,58
1	60	67	62	63,00	6,16
5	85	93	---	89,00	5,66
10	160	172	162	164,67	41,79
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	950		960,00	14,14
		970			

TABELA 11. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem TA98, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	25	21	25	24,40	1,95
		25	26		
1	20	23	19	21,00	2,08
5	30	26	29	28,00	2,83
10	25	49	27	33,67	9,01
50	67	57	62	62,00	17,94
100	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica
200	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica	tóxica
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)		400	390,00	14,14
			380		

TABELA 12. Avaliação da mutagenicidade dos produtos de redução do corante Disperse Orange 1, empregando a linhagem YG1041, na ausência de ativação metabólica (S9).

Dose (µg/placa)	Número de colônias por placa			Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3		
Sem S9					
0	52	56	58	56,80	4,09
		55	63		
0,05	48	51	46	48,33	4,73
0,1	53	51	60	54,67	4,85
0,5	-	61	56	58.50	3,54
1	79	65	57	67,00	12,43
5	130	139	146	138,33	40,02
Controle positivo	4NQO (0,5 µg/placa)	950		960,00	14,14
		970			

Apêndice C

Curvas Analíticas

Curvas Analíticas:

Foram feitas as curvas analíticas dos produtos obtidos após a oxidação e a redução dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 identificados por CLAE/DAD: Sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, nitrobenzeno, 2-cloro-4-nitrobenzamina e benzamina.

Sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada

Figura 1. Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μ l da solução padrão de Sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80:20, T = 40°C, fluxo = 1mL/min e fase estacionária C18.

Nitrobenzeno

Figura 2. Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μ l da solução padrão de Nitrobenzeno solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80:20, T = 40°C, fluxo = 1mL/min e fase estacionária C18.

2-cloro-4-nitro-benzamina

Figura 3. Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μ l da solução padrão de 2-cloro-4-nitro-benzamina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80:20, T = 40°C, fluxo = 1mL/min e fase estacionária C18.

Benzamina

Figura 4. Curva analítica obtida a partir do cromatograma correspondentes à injeção de 20 μ l da solução padrão de benzamina solubilizada em metanol. Fase móvel: Metanol/Tampão Fosfato 80:20, T = 40°C, fluxo = 1mL/min e fase estacionária C18.

Apêndice D

**Análise pelo CLAE/DAD para identificar outras possíveis
aminas**

Tentativa secundária no CLAE/DAD pra identificar possíveis aminos

Foi feita outra análise dos produtos de oxidação e redução dos corantes pelo CLAE/DAD, a fim de tentar identificar outras aminos que poderiam ser formadas, com as seguintes especificações: aminos que eluem em fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato (pH=6,9, 30 μ M) 80:20, temperatura de 40°C, vazão=1,0 mL/min, λ = 230 nm, volume injetado: 20 μ L, no entanto nenhum tipo de amina foi encontrado após a oxidação e redução dos corantes sob essas condições, como mostram as Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

Oxidação do Corante Disperse Red 1

Figura 5. Cromatograma de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1. Fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 80:20 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ = 230 nm e volume injetado= 20 μ L.

Oxidação do Corante Disperse Red 13

Figura 6. Cromatograma de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13. Fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 80:20 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ = 230 nm e volume injetado= 20 μ L.

Oxidação do Corante Disperse Orange 1

Figura 7. Cromatograma de oxidação de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1. Fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 80:20 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ = 230 nm e volume injetado= 20 μ L.

Redução do Corante Disperse Red 1

Figura 8. Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 1. Fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 80:20 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ = 230 nm e volume injetado= 20 μ L.

Redução do Corante Disperse Red 13

Figura 9. Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Red 13. Fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 80:20 (pH=6,9; 30 μ M), temperatura=40°C, vazão=1,0 mL/min, λ = 230 nm e volume injetado= 20 μ L.

Redução do Corante Disperse Orange 1

Figura 10. Cromatograma de redução de $3,18 \times 10^{-4}$ mol/L do corante Disperse Orange 1. Fase móvel: MeOH/Tampão Fosfato 80:20 (pH=6,9; $30 \mu\text{M}$), temperatura= 40°C , vazão= $1,0 \text{ mL/min}$, $\lambda = 230 \text{ nm}$ e volume injetado= $20 \mu\text{L}$.

Apêndice E

**Propostas de Fragmentação dos corantes Disperse Red 1,
Disperse Red 13 e Disperse Orange 1**

Propostas de Fragmentação dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1

Como já mencionado anteriormente, as soluções dos corantes a 6×10^{-3} mol/L, após serem submetidas aos processos de oxidação e redução químicos, foram injetadas no CG/EM. A seguir será mostrado as propostas de fragmentação de cada um dos corantes estudados.

-Disperse Red 1

A Figura 11 (A e B) mostram os cromatogramas obtidos após a injeção no CG/EM da solução do corante Disperse Red 1 a 6×10^{-3} mol/L após 4 horas de oxidação e redução, respectivamente.

De um modo geral, as duas amostras – resultado das reações de oxidação e redução do corante Disperse Red 1 – apresentaram cromatogramas semelhantes quanto aos picos majoritários ($t_R=13,576/13,513$; $14,252/14,255$ e $15,295$).

De acordo com os espectros de massas correspondentes aos picos, temos que os picos $t_R=13,576$ min e $t_R=13,513$ min (Figura 11 (A) e (B), respectivamente) são correspondentes à substância 4-nitro-benzamina (Figura 12).

A análise do espectro indica o pico do íon molecular intenso em m/z 138. Esta alta intensidade é resultante da grande estabilidade do íon molecular devido à presença de átomos com pares de elétrons desemparelhados (N e O) em ressonância com o anel benzênico (Figura 13). Benoit e Holmes (1970) descreveram o mecanismo de perda de NO do composto nitrobenzeno. Silverstein (1994) e McLafferty e Turecek (1993) citam as quebras que ocorrem na substância 4-nitrobenzamina. Baseado nestas fontes, o mecanismo de fragmentação para a 4-nitrobenzamina é apresentado na Figura 14. O pico intenso m/z 108 corresponde ao cátion I gerado pela perda do radical $\text{NO}^\cdot$ e, em seguida, este íon perde CO, formando o cátion cujo pico tem relação m/z 80. Uma via alternativa de fragmentação (Figura 15) apresenta a formação do íon m/z 108 através da perda do radical $\text{NO}_2^\cdot$ e, em sequência, este íon perde HCN formando o cátion correspondente ao pico base de relação m/z 65. Adicionalmente, anilinas com grupos nitrosil em meta e para apresentam uma perda relativa ao oxigênio correspondente ao pico de relação m/z 122.

Figura 13. Esquema de ressonância que comprova a estabilidade do cátion-radical m/z 138

Figura 14. Proposta de mecanismo de fragmentação para os sinais de m/z 108 e m/z 80, na fragmentação da 4-nitro-benzamina.

Figura 15. Proposta do mecanismo de fragmentação dos sinais em m/z 92 e m/z 65, na fragmentação da 4-nitro-benzamina.

Ainda, sobre o cromatograma relativo à redução (Figura 11 B), outro pico pode ser destacado como correspondente um produto de degradação. O pico $t_R=12,118$ min, de acordo com seu espectro de massas (Figura 16), é relativo à substância 2-(etilfenilamino)-etanol.

Para este composto, pode-se destacar que o pico do íon molecular (m/z 165) não se apresenta muito intenso, pois, devido à presença de cadeias alquílicas ligadas ao nitrogênio, as clivagens beta das ligações C-C desta amina aromática são favorecidas gerando os íons filhos correspondentes aos picos m/z 150 e m/z 134 (pico do íon molecular), como pode ser observado na Figura 17 (A). Ainda, a clivagem da ligação C-N determina a formação do íon m/z 120, e também há a ocorrência do pico característico do anel aromático monossustituído após fragmentação de seu ligante (m/z 77).

Pode-se destacar também no perfil de fragmentação deste composto, a presença do pico m/z 106 o qual é originado pela fragmentação do íon-filho m/z 150 (Figura 17 B) que, após o rearranjo de um hidrogênio favorecido pelo arranjo espacial de um anel de seis membros, onde o hidrogênio da hidroxila liga-se ao nitrogênio enquanto a ligação C-N é rompida, formando o cátion m/z 106 e um outro cátion, que, em sequência, cicliza formando a molécula neutra, oxirano.

-Disperse Red 13

Para este corante, foi seguido o mesmo procedimento realizado para o corante Disperse Red 1, a solução do corante a 6×10^{-3} mol/L foi submetida aos processos de oxidação e redução químicos e, em seguida, foi injetada no CG/EM.

A Figura 18 (A e B) mostram os cromatogramas obtidos após a injeção da solução do corante Disperse Red 13 após 4 horas de oxidação e redução, respectivamente, no CG/EM.

As amostras resultantes das reações de oxidação e redução do corante Disperse Red 13 apresentaram cromatogramas semelhantes quanto aos picos majoritários ($t_R=14,226/14,233$; $15,284/14,866$ e $17,375/17,378$), em termos qualitativos.

Assim como nas reações de oxidação e redução para o corante Disperse Red 1, na reação de redução para o corante Disperse Red 13, nota-se a presença dos compostos já discutidos 4-nitro-benzamina e 2-(etilfenilamino)-etanol. Isso indica um comportamento semelhante destes dois corantes, uma vez que possuem composição química muito próxima.

Especificamente, para o Disperse Red 13 (Figura 18), nota-se a presença de um composto de degradação bastante proeminente, o qual, segundo seus espectros de massas, corresponde ao composto 2-cloro-4-nitro-benzamina (Figura 19).

Sobre o espectro de massas da 2-cloro-4-nitro-benzamina pode-se dizer que segue o mesmo perfil de fragmentação da 4-nitro-benzamina (Figuras 12-15). O pico do íon molecular m/z 172 igualmente intenso, e as fragmentações M-30[-NO] (m/z 142), M-58 [-NO;-CO] (m/z 144), M-46 [-NO₂] (m/z 126) e M-73 [-NO₂; -HCN] (m/z 99), ocorrendo do mesmo modo que no composto não halogenado. Pode-se destacar também que estas fragmentações são “monitoradas” pela presença do halogênio cloro que, devido à sua característica isotópica (³⁵Cl ³⁷Cl (3:1)), os picos apresentam-se na forma M, M+2 (3:1). Entretanto, o pico base m/z 90, bem como o pico m/z 91 não apresentam essa característica isotópica de M, M+2, indicando que os fragmentos correspondentes não contêm mais o átomo cloro.

Deste modo, a Figura 20 apresenta a proposta de fragmentação para obtenção destes importantes picos no espectro de massas do 2-cloro-4-nitro-benzamina. Folk; Wideman (1969) investigaram uma possível competição nas vias de fragmentação de halofenóis, e mostraram que em *m*-clorofenóis ocorre uma competição entre a perda do halogênio na forma de radical e do mesmo na forma neutra (HX), sendo a última mais favorecida devido à proximidade a hidrogênios

vulneráveis. Estendendo este raciocínio para um derivado benzamínico, pode-se inferir que os picos m/z 90 e m/z 91 são formados pela perda de HCl e Cl $\cdot$ do íon m/z 126, respectivamente através de um mecanismo análogo ao proposto por Folk; Wideman (1969).

- Disperse Orange 1

Por último, a solução do corante Disperse Orange 1 a 6×10^{-3} mol/L após submeter aos processos de oxidação e redução químicos, foi injetada no CG/EM seguindo o mesmo procedimento executado para os outros corantes em estudo. A Figura 21 (A e B) mostram os cromatogramas obtidos após a injeção no CG/EM da solução deste corante após 4 horas de oxidação e redução, respectivamente.

De um modo geral, as duas amostras – resultado das reações de oxidação e redução do corante Disperse Orange 1 – apresentaram cromatogramas qualitativamente semelhantes, entretanto, alguns picos apresentaram maior intensidade em cada um dos cromatogramas. Apesar de não estarem numa mesma escala, podemos notar, por exemplo, que o pico correspondente ao tempo de retenção $t_R(A) = 13,634$ min e $t_R(B) = 13,594$ min apresenta-se muito mais intenso na reação de redução do que na reação de oxidação. Estes picos correspondem ao composto N-fenil-benzamina (Figura 22), sobre o qual podemos dizer que teve formação mais favorecida na redução do que na oxidação.

Na Figura 21, ainda comparando os cromatogramas das reações de oxidação e redução do Disperse Orange 1, através da análise dos espectros de massas dos diversos picos, pode-se verificar também a presença do pico $t_R = 16,141$ min e $t_R = 16,119$ min (Figura 21 (A) e (B)), os quais correspondem à substância N-fenil-1,4-benzenodiamina (Figura 25).

A análise do espectro de massas obtido evidencia uma alta similaridade com o padrão da N-fenil-benzamina (Figura 22). Em destaque podemos notar que o pico base m/z 169 corresponde também ao pico do íon molecular, indicando que o cátion-radical formado pela ionização da molécula em si, apresenta-se muito estável, e que este composto não fragmenta em íons mais estáveis (Figura 23). Nota-se ainda a presença de picos M-1 e M-2 relativamente intensos, os quais estão relacionados a perdas de hidrogênio tanto da amina quanto do anel aromático (Figura 24).

Figura 23. Proposta de ressonância que sugere a estabilidade do cátion-radical m/z 169.

Figura 24. Proposta de fragmentação da N-fenil-benzamina que sugere a formação dos sinais em m/z 168 e m/z 167.

Figura 25. (A) Espectro de massas das amostras (B) Espectro de massas do padrão N-fenil-1,4-benzenodiamina (similaridade de 92%).

No espectro de massas da N-fenil-1,4-benzenodiamina pode-se destacar a presença do íon molecular muito intenso, o qual também é o pico base do espectro, devido à grande conjugação existente na molécula, o que confere estabilidade ao cátion-radical devido à formação de várias canônicas (Figura 26). Outros picos de destaque, os picos m/z 107 e m/z 91, formados pelas clivagens das ligações C-N da amina secundária (Figura 27).

Ainda, nas reações de oxidação e redução do corante Disperse Orange 1, foi possível identificar mais dois compostos: a benzamina (Figura 28) e o nitrobenzeno (Figura 29).

Para estes compostos, destaca-se a alta intensidade dos picos dos íons moleculares – inclusive para a benzamina, o pico do íon molecular é o pico base – mais uma vez, devido à alta estabilidade dos cátions-radicaís formados, o que já foi demonstrado e discutido para as outras moléculas (Figuras 13, 23 e 26).

Para o nitrobenzeno (Figura 29), destacam-se os picos m/z 77 (M-46, perda do radical $\text{NO}_2^\bullet$), m/z 93 (M-30, perda do radical $\text{NO}^\bullet$), m/z 65 (M-58, perda do radical $\text{NO}_2^\bullet$, seguida pela perda da molécula neutra CO), como já foi discutido e demonstrado nas Figuras 14 e 15. No espectro de massas deste composto, pode-se ainda destacar os picos m/z 51 e m/z 50 que são formados pela perda de cadeias carbônicas do íon m/z 93.

Para a benzamina (Figura 28), além do pico do íon molecular/pico base, destacam-se os picos m/z 66 e m/z 65, que correspondem, respectivamente, à perda das moléculas neutras HCN (Figura 15) e H_2CCH_2 - característico de anéis benzênicos (McLafferty; Turecek, 1993).

Por fim, pode-se perceber que a análise dos produtos de oxidação e redução dos corantes no CG/EM foram muito úteis tanto para a confirmação dos resultados obtidos pelo CLAE/DAD como para identificação de novas substâncias formadas que, como descritas anteriormente, são compostos que representam risco tanto para a saúde humana como para o meio ambiente.