UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação eco/genotóxica dos corantes têxteis Reactive Blue
4 e Reactive Blue 15**

Gabriela Meireles

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue
4 e Reactive Blue 15**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Gabriela Meireles

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de
Oliveira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Toxicologia em 29/07/2013. A versão original encontra-se disponível
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Meireles, Gabriela

Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15, Ribeirão Preto, 2013.

90 p.:il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Oliveira, Danielle Palma

1. Corantes reativos 2. Ensaios ecotoxicológicos 3. Mutagenicidade 4. *Daphnia similis* 5. *Vibrio fischeri* 6. *Ceriodaphnia dubia* 7. *Hormesis*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Gabriela Meireles

Título do trabalho: Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais Luiz e Lourdes pela confiança, exemplo, amor incondicional e, principalmente, por me motivarem a seguir meus sonhos, mesmo quando me pareciam distantes.

Amo vocês!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pelas bênçãos e por estar ao meu lado sempre.

Aos meus pais, pela confiança, amor, apoio e por compartilharem dos meus sonhos.

À minha grande família, especialmente às minhas irmãs, meus exemplos, por me ajudarem a transformar um sonho em realidade, pela confiança no meu trabalho e pelas doces ou duras palavras que me tornaram melhor.

Ao meu grande amor Caio, por dar mais brilho aos meus dias, pela compreensão, carinho, apoio imensurável e amizade. Especialmente pela confiança depositada em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Danielle, por todas as oportunidades, conhecimento compartilhado, amizade, compreensão, incentivo e por ser um belo exemplo de dedicação e sabedoria.

Aos amigos da CETESB de Ribeirão de Preto: Eduardo, Matheus, Adib, Joaquim, Carolina, Renata, Fred, Queiroz, Valtinho, Luiz, Tereza, Walter e Diego pela receptividade, conselhos e ajuda. Especialmente à Fátima, Maristela e André pelo grande apoio no desenvolvimento do trabalho, ensinamentos, longas conversas e principalmente pela amizade. Vocês são uma equipe nota 1000 e foi uma honra trabalhar com vocês!

Aos amigos da CETESB de São Paulo: Deborah, Celso, Daniela, Wallace, Cíntia, Rosalina e Sandra por todo auxílio e receptividade. Especialmente à Célia pelos ensinamentos, paciência, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Daniel pelos ensinamentos, sugestões e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando pela receptividade, ensinamentos e contribuições no meu trabalho.

Aos pós graduandos Bruno e Vanessa por toda receptividade e ajuda no trabalho.

À minha grande amiga Nara, pelas conversas diárias, conselhos, paciência, ajuda na revisão do trabalho, por me acalmar e confortar nos momentos difíceis e por estar sempre ao meu lado mesmo distante.

À minha grande amiga Josiane, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, receptividade, agradáveis conversas e eterna amizade.

Aos companheiros de laboratório, Gisele, Daniela, Eloísa, Farah, Elisa, Thalita e Klaus pelos ensinamentos e apoio.

Às secretárias da pós graduação, Rosemary e Rosana, pela dedicação, excelente trabalho desenvolvido e receptividade.

Às agências de fomento FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do trabalho e pelas oportunidades de difundir a ciência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Universidade de São Paulo pelo suporte no trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

MEIRELES, G. Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15. 2013. 90f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Os corantes são amplamente utilizados nas indústrias têxteis, farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, fotográficas, entre outras. Contudo, essas substâncias podem ser tóxicas, mutagênicas e resistentes a muitos processos de degradação utilizados em estações de tratamento. Estima-se que cerca de 15% dos corantes utilizados no mundo sejam perdidos durante o processo de tingimento e lançados no ambiente, atingindo principalmente os corpos d'água. No entanto, apesar da grande quantidade de corantes comerciais disponíveis e da alta quantidade lançada no ecossistema aquático, os estudos sobre a toxicidade dessas substâncias são escassos e pouco se conhece sobre seus efeitos mutagênicos e principalmente ecotoxicológicos. Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a ecotoxicidade, bem como a capacidade dos corantes têxteis Reactive Blue 4 (RB 4) e Reactive Blue 15 (RB 15) de lesar o material genético, empregando ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*, toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, genotoxicidade (Teste do Cometa) com fibroblastos de derme humana e mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*. Adicionalmente, avaliou-se a concentração de cobre em *Ceriodaphnia dubia* expostas ao corante Reactive Blue 15, que possui esse metal na sua estrutura química. O corante RB 4 foi moderadamente tóxico e o corante RB 15 foi relativamente não tóxico para *Daphnia similis*. Ambos corantes reduziram a luminescência de *Vibrio fischeri* em elevadas concentrações, sendo o corante RB 4 mais tóxico para a bactéria quando comparado ao corante RB 15. O corante RB 4 induziu efeito *hormesis* nos ensaios com *C. dubia*, ou seja, houve um estímulo na reprodução nas menores concentrações, seguido por um decréscimo em concentrações mais elevadas, ao passo que, o corante RB 15 reduziu a fecundidade de *C. dubia*. Não houve acúmulo de cobre nos organismos expostos ao corante RB 15. Nenhum dos corantes foram genotóxicos para fibroblastos de derme humana e apenas o corante RB 4 induziu mutagenicidade, por substituição de pares de base. Os resultados obtidos mostram que os corantes podem causar efeitos adversos nos organismos mesmo em baixas concentrações e que o lançamento contínuo dessas substâncias nos corpos d'água é preocupante.

Palavras - chave: Corantes reativos, Mutagenicidade, Ensaio ecotoxicológicos, *Daphnia similis*, *Vibrio fischeri*, *Ceriodaphnia dubia*, *Hormesis*.

ABSTRACT

MEIRELES, G. Evaluation eco/genotoxicological of the textile dyes Reactive Blue 4 and Reactive Blue 15. 2013. 90f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Dyes are widely used in different types of industries, such as textile, pharmaceutical, food, cosmetics, photographic, among others. However, these substances can be toxic, mutagenic and resistant to many degradation processes used in wastewater treatment. It is estimated that about 15% of the dyes used in the world is lost during the dyeing process and released into the environment, affecting mainly water bodies. However, despite the large amount of commercial dyes available and high quantity released in the aquatic ecosystem, studies on the toxicity of these substances are scarce and little is known about their mutagenic and ecotoxicological effects. Considering that, the aim of this study was to evaluate the ecotoxicity, and the ability of the Reactive Blue 4 (RB 4) and Reactive Blue 15 (RB 15) textile dyes to damage the genetic material, using acute toxicity tests with *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*, *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity, genotoxicity (Comet assay) in human dermal fibroblasts and mutagenicity with *Salmonella typhimurium*. Additionally, we assessed the concentration of copper in *Ceriodaphnia dubia* exposed to the Reactive Blue 15 dye, which has this metal in its chemical structure. The RB 4 dye was moderately toxic and RB 15 dye was relatively non-toxic to *Daphnia similis*. Both dyes reduced the *Vibrio fischeri* luminescence in high concentrations, and the RB 4 was more toxic to bacteria when compared to dye RB 15. The RB 4 dye induced hormesis effect in the *C. dubia* tests. We observed that the reproduction was stimulated at lower concentrations followed by a decrease at higher concentrations. While the RB 15 dye reduced fecundity of *Ceriodaphnia dubia*. There was no accumulation of copper in organisms exposed to the RB 15 dye. None of the dyes were genotoxic to human dermal fibroblasts, and only the RB 4 dye induced mutagenicity, by base-pair substitution. The results show that the dyes can cause adverse effects on organisms even at low concentrations and that the continuous release of these substances in water bodies is worrying.

Keywords: Reactive dyes, Mutagenicity, Ecotoxicological assays, *Daphnia similis*, *Vibrio fischeri*, *Ceriodaphnia dubia*, *Hormesis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas químicas dos corantes têxteis estudados no presente trabalho: Reactive Blue 4 (A) e Reactive Blue 15 (B).....	04
Figura 2.	Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria <i>Vibrio fischeri</i> após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 4 sem ajuste de pH.....	40
Figura 3.	Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria <i>Vibrio fischeri</i> após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 4 com ajuste de pH.....	41
Figura 4.	Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria <i>Vibrio fischeri</i> após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 15 sem ajuste de pH.....	41
Figura 5.	Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria <i>Vibrio fischeri</i> após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 15 com ajuste de pH.....	42
Figura 6.	Número médio de neonatas produzidas por jovens de <i>Ceriodaphnia dubia</i> após sete dias de exposição ao corante Reactive Blue 4.....	43
Figura 7.	Número médio de neonatas produzidas por jovens de <i>Ceriodaphnia dubia</i> após sete dias de exposição ao corante Reactive Blue 15.....	44
Figura 8.	Concentração de cobre (ng/organismo) em <i>Ceriodaphnia dubia</i> expostas por 7 dias a diferentes concentrações de cobre, presente na água de cultivo (controle negativo) e soluções do corante Reactive Blue 15.....	46
Figura 9.	<i>Tail moment</i> observado no ensaio de genotoxicidade Cometa empregando células de fibroblastos de derme humana expostas ao corante Reactive Blue 4.....	47
Figura 10.	<i>Tail moment</i> observado no ensaio de genotoxicidade Cometa empregando células de fibroblastos de derme humana expostas ao corante Reactive Blue 15.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características genéticas das linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> empregadas nos ensaios de mutagenicidade deste trabalho.....	15
Tabela 2.	Concentração de cloreto de potássio (KCl) que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos (<i>Daphnia similis</i>) ao sal por 48 horas sem iluminação e alimento nos ensaios de sensibilidade realizados no período dos testes de toxicidade aguda com os corantes	37
Tabela 3.	Imobilidade de <i>Daphnia similis</i> expostas ao corante Reactive Blue 4 por 48 horas sem iluminação e alimento e valor de CE_{50} obtido pelo programa Trimmed Spearman Karber.....	38
Tabela 4.	Imobilidade de <i>Daphnia similis</i> expostas ao corante Reactive Blue 15 por 48 horas sem iluminação e alimento e valor de CE_{50} obtido pelo programa Trimmed Spearman Karber.....	38
Tabela 5.	Valores de CE_{50} obtidos nos ensaios de sensibilidade com <i>Vibrio fischeri</i> após exposição ao sulfato de zinco por 15 minutos.....	39
Tabela 6.	Valores de CENO, CEO, CI_{25} e CI_{50} obtidos nos ensaios de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> exposta ao corante Reactive Blue 4 por 7 dias	44
Tabela 7.	Valores de CENO, CEO, CI_{25} e CI_{50} obtidos nos ensaios de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> exposta ao corante Reactive Blue 15 por 7 dias.....	45
Tabela 8.	Comparação entre o número médio de neonatas produzidas por adultas de <i>Ceriodaphnia dubia</i> no controle negativo e tratamentos com o corante Reactive Blue 4 em três repetições nos ensaios de toxicidade crônica.....	45
Tabela 9.	Comparação entre o número médio de neonatas produzidas por adultas de <i>Ceriodaphnia dubia</i> no controle negativo e tratamentos com o corante Reactive Blue 15 em três repetições nos ensaios de toxicidade crônica.....	46
Tabela 10.	Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Blue 4 com as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, YG1041 2 YG1042.....	49
Tabela 11.	Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Blue 15 com as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, YG1041 2 YG1042.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQUM:	Associação Brasileira da Indústria Química
ABIT:	Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção
ABNT:	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CAS:	Chemical Abstracts Service
CENO:	Concentração de Efeito Não Observado
CEO:	Concentração de Efeito Observado
CETESB:	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra acético
GHS:	Globally Harmonization System of Classification and Labeling of Chemicals
M:	Molar
mA:	Miliampere
mM:	Milimolar
NADP:	β Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PBS:	Tampão fosfato salino
pH:	Potencial hidrogeniônico
RB 15:	Reactive Blue 15
RB 4:	Reactive Blue 4
rpm:	Rotações por minuto
SBMCTA:	Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogenese e Teratogenese Ambiental
V:	Volt
°C:	Graus Celsius
15':	Após 15 minutos

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Classificação dos corantes.....	4
1.2 Toxicidade dos corantes têxteis	6
1.3 Ensaios ecotoxicológicos	8
1.3.1 <i>Ensaio de toxicidade com Daphnia similis e Ceriodaphnia dubia</i>	9
1.3.2 <i>Ensaio de toxicidade aguda com Vibrio fischeri</i>	11
1.4 Genotoxicidade	11
1.4.1 <i>Teste do Cometa</i>	12
1.4.2 <i>Ensaio de mutagenicidade com Salmonella typhimurium</i>	13
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Corantes estudados	19
3.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	20
3.2.1 <i>Soluções utilizadas</i>	20
3.2.2 Manutenção dos organismos teste.....	21
3.2.3 <i>Teste de sensibilidade ao cloreto de potássio</i>	21
3.2.4 <i>Testes de toxicidade com corantes têxteis</i>	22
3.3 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	22
3.3.1 <i>Soluções utilizadas</i>	23
3.3.2 <i>Organismo teste</i>	23
3.3.3 <i>Teste de sensibilidade ao sulfato de zinco</i>	23
3.3.4 <i>Testes de toxicidade com os corantes têxteis</i>	24
3.4 Ensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	24

3.4.1	<i>Organismo teste</i>	24
3.4.2	<i>Meio de cultivo</i>	25
3.4.3	<i>Teste de sensibilidade ao cloreto de sódio</i>	25
3.4.4	<i>Testes de toxicidade com corantes têxteis</i>	25
3.5	<i>Quantificação de cobre em Ceriodaphnia dubia</i>	26
3.6	<i>Teste de genotoxicidade Cometa</i>	26
3.6.1	<i>Soluções utilizadas</i>	26
3.6.2	<i>Cultura de fibroblastos de derme humana adulta</i>	28
3.6.2.1	<i>Cultura inicial e congelamento das células</i>	28
3.6.2.2	<i>Descongelamento das células</i>	29
3.6.2.3	<i>Repique e manutenção das células</i>	29
3.6.3	<i>Procedimento para o teste do Cometa</i>	29
3.6.4	<i>Teste de viabilidade celular</i>	30
3.7	<i>Ensaio de mutagenicidade com Salmonella typhimurium</i>	31
3.7.1	<i>Soluções utilizadas</i>	31
3.7.2	<i>Procedimento para o ensaio de mutagenicidade</i>	33
3.7.3	<i>Avaliação da viabilidade</i>	34
3.8	<i>Análise estatística</i>	34
4.	RESULTADOS	37
4.1	<i>Toxicidade aguda com Daphnia similis</i>	37
4.1.1	<i>Teste de sensibilidade ao cloreto de potássio</i>	37
4.1.2	<i>Testes de toxicidade com os corantes têxteis</i>	37
4.2	<i>Toxicidade aguda com Vibrio fischeri</i>	39
4.2.1	<i>Teste de sensibilidade ao sulfato de zinco</i>	39
4.2.2	<i>Testes de toxicidade com os corantes têxteis</i>	39
4.3	<i>Toxicidade crônica com Ceriodaphnia dubia</i>	42
4.3.1	<i>Teste de sensibilidade ao cloreto de sódio</i>	42
4.3.2	<i>Testes de toxicidade com os corantes têxteis</i>	42
4.4	<i>Quantificação de cobre em Ceriodaphnia dubia</i>	46
4.5	<i>Teste de genotoxicidade/Ensaio do Cometa</i>	46
4.6	<i>Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium</i>	48
5.	DISCUSSÃO	52

6. CONCLUSÕES.....	63
---------------------------	-----------

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
---	-----------

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais tem se tornado cada vez mais frequentes e acentuados (KUNZ et al., 2002). Dentre os compartimentos ambientais afetados pela contaminação e poluição, as águas merecem destaque, visto que são os principais receptáculos dos contaminantes, tanto de forma direta, através de fontes pontuais ou de forma indireta, por processos de migração dos poluentes (COSTA et al., 2008; RAJAGURU et al., 2001). De acordo com Parikh, Shah e Madamwar (2006), 70% dos resíduos industriais gerados são liberados no ecossistema aquático, reduzindo a quantidade e qualidade dos recursos hídricos. Dentre os diferentes setores industriais, o ramo têxtil tem recebido grande atenção devido ao seu elevado potencial poluidor (CÉRON-RIVERA; DÁVILLA-JIMÉNEZ; ELIZALDE-GONZÁLEZ, 2004).

A indústria têxtil tem importante papel na economia mundial. No Brasil há cerca de trinta mil empresas distribuídas por todo território nacional, gerando mais de 1,7 milhões de empregos e com um faturamento anual de US\$ 56,7 bilhões. Com isso, o Brasil se tornou o sexto maior produtor têxtil do mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO [ABIT], 2013). Contudo, considerando o volume e composição dos efluentes gerados, a indústria têxtil é a mais poluente dentre todos os setores industriais. Esse setor consome grande quantidade de água (cerca de 150 litros para cada quilo de algodão tingido) e, conseqüentemente, gera enormes volumes de efluentes de composição diversa, variando desde substâncias inorgânicas até orgânicas. Dentre as diferentes substâncias há sais, aditivos, detergentes, surfactantes e principalmente corantes, tornando o tratamento muito difícil (HAI; YAMAMOTO; FUKUSHI, 2006; JADHAV et al., 2010; ROBINSON et al., 2001; ANASTASI et al., 2011). Além disso, dentre as empresas do ramo têxtil presentes no Brasil, uma parte expressiva é de pequeno porte, dificultando a fiscalização (GUARATINI; ZANONI, 2000).

A descarga de efluentes têxteis causa alterações no corpo d'água receptor, principalmente modificações estéticas e redução da qualidade do ambiente. A presença de cor na água reduz a quantidade de luz solar para os organismos fotossintetizantes, resultando em um decréscimo nas concentrações de oxigênio nos ecossistemas aquáticos. Além disso, os corantes e seus produtos de degradação

podem causar efeitos tóxicos aos organismos (CHAMPAGNE; RAMSAY, 2010; KARIYAJJANAVAR; JOGTTAPPA; NAYARA, 2011; KOLEKAR et al., 2012).

Além da aplicação têxtil, os corantes são utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética, de papel, fotográfica, entre outras (GONEN; AKSU et al., 2009; TILLI et al., 2011). Mais de 700.000 toneladas de corantes são consumidas anualmente no mundo, sendo cerca de 26.500 toneladas consumidas apenas no Brasil (KUNZ et al., 2002; SOUZA; FORGIARINI; SOUZA, 2007). Infelizmente, estimam-se que 15% da produção total de corantes sejam perdidas durante a síntese, processamento e utilização dessas substâncias (PEKAKIS et al., 2006). É evidente que o processo de industrialização é importante, contudo a poluição causada pelas indústrias não pode ser negligenciada.

Dentro deste contexto e sabendo de sua ampla utilização na indústria têxtil, no presente trabalho foram avaliados dois corantes têxteis reativos, Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15 (Figura 1). Considerando que os grupos cromóforos podem interferir na toxicidade dos produtos, esses corantes foram escolhidos por apresentarem diferentes grupos cromóforos, sendo esses, antraquinona e cobreftalocianina, respectivamente.

Figura 1. Estruturas químicas dos corantes têxteis estudados no presente trabalho: Reactive Blue 4 (A) e Reactive Blue 15 (B)

Assim, avaliou-se a capacidade desses corantes em lesar o material genético, empregando os ensaios de mutagenicidade com *Salmonella* e Cometa em fibroblastos de derme humana. Além disso, ensaios ecotoxicológicos empregando microcrustáceos e bactéria foram realizados a fim de identificar os efeitos da exposição a estes compostos em organismos aquáticos. Adicionalmente, o corante Reactive Blue 15 foi escolhido por apresentar um átomo de cobre em sua estrutura química e foi utilizado para avaliar a capacidade deste metal em bioacumular-se em organismos aquáticos expostos a esta substância.

1.1 Classificação dos corantes

Os corantes são compostos coloridos que absorvem luz em uma região do espectro visível e são capazes de conferir coloração à diferentes materiais. Eles se prendem ao material por adsorção, solução, retenção ou ligações químicas iônicas ou covalentes (ABIQUIM, 2013; IQBAL, 2008; GUARATINI; ZANONI, 2000).

Existem cerca de 10.000 diferentes corantes empregados industrialmente, a fim de atender às exigências do mercado consumidor que busca diversidade de tons e estabilidade da cor. Essas substâncias são classificadas de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo, ftalocianina, etc) ou de acordo com o método pelo qual é fixado à fibra têxtil (reativos, diretos, azóicos, ácidos, à cuba, pré metalizados e branqueadores) (GUARATINI; ZANONI, 2000). Como já citado, os corantes avaliados neste trabalho são reativos com a estrutura química representada por antraquinona e cobreftalocianina. Assim, maior ênfase será dada à essas classes de corantes.

Os corantes reativos são utilizados no tingimento de algodão, lã e fibras de poliamida. Essa classe deve ser vista com grande atenção, uma vez que apresentam um mercado crescente e dificuldades no tratamento de efluentes gerados, pois são pouco absorvidos por biomassa e não degradados em condições aeróbicas existentes em métodos convencionais empregados nas estações de tratamento (BEYDILLI; PAVLOSTATHIS; TINCHER, 2000; EPOLITO et al., 2008; VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998; WANG et al., 2002). Outra grande preocupação ambiental em relação aos corantes reativos é sua baixa fixação às fibras, o que resulta em grandes perdas durante o banho de tingimento. Em condições típicas, até 50% da concentração inicial dos corantes reativos utilizada no banho pode não se fixar à fibra têxtil, devido a reações paralelas indesejáveis de hidrólise, pois o grupo quimicamente ativo do corante reage com a hidroxila do meio, tornando-o inativo para reação com a hidroxila ou amina da fibra, culminando em uma baixa eficiência de fixação e uma perda de mais de 800 mg/L. Logo, os corantes reativos podem ser facilmente encontrados no ecossistema aquático, afetando a comunidade e contaminando a água utilizada para abastecimento (GOZMEN et al., 2009; GUARATINI; ZANONI, 2000; CARNEIRO et al., 2005; OSUGI et al., 2006; AKSU; ISOGLU, 2006).

Com relação à estrutura química, os corantes mais comuns são aqueles que possuem grupo cromóforo (estrutura química) tipo azo (aproximadamente 70% do total produzido), seguido pelo tipo antraquinona (VANDEVIVERE; BIANCHI;

VERSTRAETE, 1998). Alguns corantes possuem metais na sua estrutura química, como cobre, cromo e cobalto, a fim de melhorar suas propriedades, como estabilidade da cor e ligação do corante com a fibra têxtil.

A toxicidade do corante é dependente da estrutura química e pequenas alterações na molécula podem modificar os efeitos causados, por isso é importante avaliar correta e individualmente cada corante (UMBUZEIRO et al. 2005).

1.2 Toxicidade dos corantes têxteis

Trabalhos científicos têm mostrado o potencial dos corantes têxteis em causar efeitos tóxicos aos organismos (ANASTASI et al., 2011; WANG et al., 2002; SCHNEIDER; HAFNER; JAGER, 2004; CARNEIRO et al., 2010; LIMA et al., 2007; FERRAZ et al. 2011). A exposição humana aos corantes têxteis pode ocorrer através do consumo de água contaminada ou contato com a pele, podendo gerar metabólitos ativos pela ação de microrganismos intestinais ou dérmicos (TSUBOY et al., 2007).

Os corantes reativos são estruturados para reagirem com grupamentos hidroxila e amino das fibras têxteis, porém, esses grupamentos estão presentes em todos os organismos vivos, representado por proteínas e enzimas, por exemplo. Logo, podem interagir com esses compostos endógenos e causarem efeitos tóxicos (VENKATARAMAN, 1974 apud GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 06).

Dentre os corantes, aqueles com grupamento azo têm atraído maior atenção, pois a biotransformação dos mesmos pode gerar compostos de elevada toxicidade, como aminas e benzidinas com potencial carcinogênico. Existem milhares de azo corantes disponíveis no mercado e vários deles foram classificados como carcinogênicos. A comunidade europeia banuiu o uso de corantes a base de benzidina desde 2003 (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002). No entanto, países menos desenvolvidos como Brasil, México e Argentina não cessaram completamente a produção de alguns corantes a base de benzidina como o corante Congo Red (GUARATINI; ZANONI, 2000). Essa amina aromática foi detectada em efluentes de indústria têxtil no Brasil, confirmando que este composto ainda está presente nos processos de tingimento (MAZZO et al., 2006). Os efeitos tóxicos de corantes têxteis reportados na literatura referem-se principalmente aos azo corantes, porém outras classes devem ser estudadas, uma vez que, podem desencadear efeitos adversos nos organismos e ambiente. Como exemplo, tem-se o

corante Disperse Blue 1, que possui o grupo cromóforo antraquinona e está diretamente associado ao câncer de bexiga urinária (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2011). Novotný et al. (2006) avaliaram a toxicidade de quatro corantes, dois azo e dois antraquinona, e observaram que o corante antraquinona Disperse Blue 3 foi o mais tóxico para a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapita* e o protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis*, além de induzir efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium*.

Wang et al. (2009) investigaram a toxicidade de 14 derivados de corante do tipo antraquinona e observaram que todos não foram tóxicos para *Daphnia magna* em condições de ausência de luz. No entanto, na presença de luz, 11 dessas substâncias induziram toxicidade aguda ao microcrustáceo.

A adição de metais em corantes pode causar diversos efeitos deletérios ao ecossistema, interferindo no ciclo de vida dos organismos, podendo alterar a reprodução, crescimento e desenvolvimento, além de influenciar no comportamento. Esses efeitos podem modificar as interações biológicas e interferir na dinâmica de populações, podendo causar desequilíbrio ecológico (BAE; FREEMAN, 2007; GONEN; AKSU, 2009; LAWS, 2000). Além disso, os metais são frequentemente encontrados em efluentes têxteis, tanto na forma iônica livre como complexado, aumentando a preocupação ambiental (JADHAV et al., 2010). Eles podem ser assimilados e retidos nos organismos, tanto de forma direta, pelo ambiente, ou de forma indireta, através de alimento contaminado. Nesse caso, os metais são acumulados mais rapidamente que excretados ou detoxificados (KHAN; BURY; HOGSTRAND, 2011). Tais processos podem levar ao acúmulo do contaminante nos organismos e possível biomagnificação, ou seja, os agentes são transferidos de um nível trófico para outro através da alimentação, resultando no aumento da concentração ao longo da cadeia alimentar (BURATINI; BRANDELLI, 2006; GONEN; AKSU, 2009).

Dentre os metais, o cobre é um metal traço essencial para todos os organismos vivos, atuando como cofator em um grande número de atividades enzimáticas, como o transporte de elétrons. No entanto, em elevadas concentrações pode inibir o metabolismo celular, alterar processos bioquímicos e fisiológicos, como síntese protéica, divisão celular, fotossíntese, induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, conduzindo ao dano celular, dentre outros (OCHOA-HERRERA et al., 2011; KHAN; BURY; HOGSTRAND, 2011). Outros estudos também demonstram

que esse elemento é capaz de causar alterações reprodutivas como oligoespermia em animais experimentais (SURYAVATHI et al., 2005).

Existem alguns dados na literatura que sugerem a toxicidade do corante avaliado neste estudo, Reactive Blue 15. Rajaguru et al. (2001) verificaram que esse corante foi capaz de causar dano significativo em eritrócitos de girino e afirmam que o mesmo pode representar um risco para a saúde humana e para organismos aquáticos. Bae e Freeman (2007) avaliaram diferentes corantes diretos complexados com cobre e observaram que todos foram capazes de causar elevada toxicidade em dafinídeos, sugerindo um dano para o ecossistema receptor.

Dentro deste contexto, os corantes Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15 foram avaliados empregando ensaios eco e genotoxicológicos, como serão apresentados a seguir.

1.3 Ensaios ecotoxicológicos

As análises químicas são comumente adotadas no monitoramento da poluição. Parâmetros como oxigênio dissolvido, demanda química e bioquímica de oxigênio, presença de alguns contaminantes, dentre outros são bastante empregados. Entretanto, as análises químicas podem ser limitadas e indicar apenas a natureza dos poluentes, não fornecendo informações sobre seus efeitos biológicos, principalmente frente às misturas complexas (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008). Logo, torna-se fundamental a realização de ensaios ecotoxicológicos, caracterizados como complementos ideais para as análises químicas na identificação e avaliação da toxicidade (MA et al., 1999). Bioensaios mensuram mudanças na fisiologia ou comportamento dos organismos vivos resultantes de estresse induzidos por compostos tóxicos químicos ou biológicos, que podem causar distúrbios no metabolismo (GIROTTI et al., 2008).

Desta forma, os testes ecotoxicológicos são ferramentas muito úteis para identificação de impactos ambientais e o uso destes tem se mostrado uma alternativa importante para a avaliação global da contaminação aquática. Muitos países têm adotado os ensaios biológicos no monitoramento da qualidade da água e há um crescente aumento no interesse de indústrias e governo de utilizarem os bioensaios para determinação da toxicidade de substâncias químicas e efluentes industriais, conduzindo para o desenvolvimento de ensaios mais rápidos, simples,

baratos e com organismos sensíveis (ZHANG et al., 2005; MARTINS; TELES; VASCONCELOS, 2007; MENDONÇA et al., 2009).

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser classificados como agudos ou crônicos, diferindo principalmente na duração e respostas mensuradas. Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos severos, como mortalidade ou imobilidade, sofridos pelos organismos expostos ao agente tóxico por um curto período de tempo, geralmente de 24 a 96 horas. Os efeitos agudos no ambiente aquático podem ser representados por acidentes ambientais ou lançamento de efluentes industriais sem tratamento. Em contrapartida, os ensaios crônicos avaliam os efeitos decorrentes de exposições a concentrações subletais do contaminante por todo ou parte do ciclo de vida do organismo. Esses ensaios possibilitam avaliar os efeitos de concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas podem comprometer funções biológicas. O lançamento contínuo de efluentes tratados representa exposição crônica, pois os organismos estão expostos aos contaminantes por longo período de tempo, mesmo em baixas concentrações (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006; COSTA et al., 2008).

Diferentes organismos podem ser empregados na avaliação da toxicidade. No entanto, é importante apresentar seletividade e sensibilidade constante aos contaminantes, elevada disponibilidade e abundância, estabilidade genética, representatividade no seu nível trófico, importância ambiental e comercial, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório e finalmente a biologia conhecida. Dentre os organismos teste, as algas, crustáceos, peixes e bactérias são mais utilizados e difundidos (COSTA et al., 2008). Neste trabalho, utilizamos microcrustáceos e bactérias como organismo teste.

1.3.1 Ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*

Microcrustáceos zooplancônicos estão entre os grupos mais sensíveis a agentes estressores (GUTIERREZ; PAGGI; GAGNETEN, 2012). Dentre os microcrustáceos, os cladóceros são globalmente utilizados como organismos teste em avaliações ecotoxicológicas, principalmente pelo pequeno tamanho, sensibilidade a várias substâncias tóxicas, reprodução partenogenética, ampla distribuição, elevada densidade e rápido crescimento populacional (SARMA; NANDINI, 2006). *Daphnia* e *Ceriodaphnia* (Crustacea, Cladocera), comumente chamadas de pulga d'água, são organismos filtradores encontrados em ambientes

aquáticos e ocupam uma importante posição na cadeia alimentar, pois constituem uma das principais fontes de alimento para peixes e invertebrados predadores. Além disso, tem importante papel no controle populacional de algas, que podem interferir na qualidade dos corpos d'água (TATARAZAKO; ODA, 2007). Os ensaios de toxicidade mais difundidos mundialmente são testes com os organismos *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, sendo o último organismo mais empregado para ensaios de longa duração (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Muitas espécies do gênero *Daphnia* são empregadas nos ensaios de toxicidade, sendo que *Daphnia magna* é a mais utilizada. No Brasil, a espécie *Daphnia similis* tem sido muito usada nos ensaios de toxicidade aguda. Embora essa espécie não ocorra naturalmente em nosso país, ela é facilmente cultivada sob as condições de laboratório e apresenta sensibilidade muito semelhante à *Daphnia magna* (COSTA et al., 2008; BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004).

Daphnia têm em média de 0,5 a 5,00 mm de comprimento, são organismos filtradores que se alimentam de algas, bactérias e matéria orgânica. A reprodução é partenogenética, originando apenas fêmeas, porém machos podem aparecer devido ao estresse, como falta de alimento, superpopulação ou mudanças ambientais. As fêmeas em condições adversas também podem dar origem a ovos de resistência, denominados efípios e caracterizados pela coloração escura e rigidez (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006). Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* mensuram os valores de concentração que causam efeitos, como a imobilidade, em 50% dos organismos expostos após um período de 24 ou 48 horas (ABNT, 2009).

Ceriodaphnia dubia é um microcrustáceo de regiões temperadas, com 0,8 a 0,9 mm de comprimento e apresenta biologia muito semelhante à *Daphnia*. Ensaios com essa espécie têm sido amplamente utilizados em ensaios de toxicidade crônica, principalmente pela sensibilidade e menor tempo de exposição (7 dias) comparado com *Daphnia* (21 dias) (CONSTANTINE; HUGGETT, 2010; DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006; ABNT, 2010, VERSTEEG et al., 1997). Segundo Shen et al. (2012), *C. dubia* apresenta sensibilidade a uma gama de compostos comparado com outros invertebrados aquáticos e tem sido utilizado mundialmente como um organismo teste para detectar a presença de contaminantes químicos.

Nos ensaios de toxicidade crônica com *C. dubia* é possível mensurar os valores de concentração que causam decréscimo na reprodução, bem como,

estabelecer valores de CENO (Concentração mais elevada da amostra em que não se observa efeito estatisticamente significativo comparado ao controle) e CEO (Concentração mais baixa da amostra que se observa efeitos estatisticamente significativos comparado ao controle) (ABNT, 2010).

1.3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

O ensaio de inibição da luminescência com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* foi proposto em 1979 por Bulich. *V. fischeri* é uma bactéria luminescente gram negativa que tem sido empregada em vários kits comerciais para avaliação da toxicidade, como Microtox, Aboatox, LUMISTox e ToxAlert (BULICH, 1979; PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008).

O ensaio é amplamente utilizado devido à rapidez (5-30 minutos), baixo custo, reprodutibilidade, sensibilidade e baixa quantidade de amostra requerida. A luminescência é produto da respiração celular e processos metabólicos. Substâncias tóxicas podem interagir em diferentes níveis celulares, como membrana celular, cadeia de transporte de elétrons, constituintes citoplasmáticos e essas alterações levam à redução da luminescência de *V. fischeri* que pode ser mensurada. Esse teste é um bom indicador de atividade metabólica e apresenta boa correlação com muitos testes de toxicidade *in vivo* (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008; GIROTTI et al., 2008, BONNET et al., 2008; BRIX et al., 2009; MA et al., 1999; BIZANI et al., 2006; FERRAZ; GRANDO; OLIVEIRA, 2011).

Esse teste pode ser utilizado para mensurar a toxicidade de substâncias puras ou misturas de compostos para todos os tipos de amostras, como águas superficiais, subterrâneas ou efluentes. Embora muitas vezes utilizado para amostras aquosas, é possível empregá-lo também na avaliação de amostras de solo e sedimento (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008). O ensaio de inibição da bioluminescência tem sido utilizado como o primeiro teste em uma bateria de ensaios na avaliação da toxicidade, devido principalmente ao tempo de análise, custo e boa correlação com outros testes empregando algas, crustáceos e peixes, além de auxiliar na identificação de compostos tóxicos para humanos e mamíferos (GIROTTI et al., 2008).

1.4 Genotoxicidade

Os poluentes ambientais podem causar alterações genéticas diretas e indiretas nas populações e resultar num processo denominado “micro-evolução devido à poluição”. As alterações diretas relacionam-se com o dano causado no material genético, como mutações, rearranjos e outros; e as alterações indiretas são resultados de modificações na variabilidade genética (GUARATINI et al., 2008).

Uma substância é dita genotóxica quando é capaz de interagir com o DNA diretamente ou após ativação metabólica, causando danos na estrutura e/ou função da molécula de DNA (WEISBURGER, 1999). Quando ocorre um dano no DNA, a célula interrompe seu ciclo celular e tenta reparar a lesão através do sistema de reparo, presente em todos os organismos. Se houver sucesso no reparo, o ciclo celular prossegue, porém, se houver falhas, a célula pode ser conduzida à senescência, apoptose ou mutação, que pode resultar em carcinogênese (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008). A mutação é uma alteração no material genético que pode ocorrer em células somáticas ou germinativas e que foram transmitidas para as células-filhas ou para a prole, respectivamente, podendo ocorrer de forma espontânea ou induzida por mutágenos e resultar em carcinogênese (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008; BENIGNI; BOSSA, 2011). Esse evento ocorre em todos os seres vivos, atuando no processo de evolução e diversidade das espécies. Contudo, os agentes mutagênicos são capazes de acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que podem acarretar em efeitos deletérios (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

As mutações podem ser cromossômicas ou gênicas. Nas mutações cromossômicas ocorrem alterações estruturais ou numéricas nos cromossomos. As mutações gênicas são consideradas pequenas alterações na sequência do DNA, confinadas em um único gene, são substituições, pequenas adições ou deleções. Esse tipo de mutação também pode ser chamada de mutação de ponto (PRESTON; HOFFMANN, 2012).

1.4.1 Teste do Cometa

O teste do Cometa é um ensaio de genotoxicidade capaz de detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem se tornar mutações. Dessa forma, o ensaio identifica mudanças muito pequenas na estrutura do DNA que podem ser passíveis de correção pelo sistema de reparo. Esse ensaio é considerado uma ferramenta importante na avaliação de compostos genotóxicos, pois é sensível,

rápido, econômico e requer pouca quantidade de células para sua realização. Adicionalmente, pode ser realizado tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que não são necessárias células em divisão para a realização do ensaio como ocorre em outros testes para detecção de danos no DNA, possibilitando o uso de diversos tipos celulares (TICE et al., 2000; SASAKI et al., 1997; GONTIJO; TICE, 2003).

Na década de 80, o ensaio do cometa, também conhecido como SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis*) foi proposto por Ostling e Johanson (1984) e anos depois, Singh et al. (1988) modificaram algumas condições propostas, criando a versão alcalina (solução de eletroforese com $\text{pH} > 13$), possibilitando a detecção de quebra de fita simples, sítio álcali-lábeis no DNA, além das quebras de dupla fitas, já visualizadas com o protocolo inicial (OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988; GONTIJO; TICE, 2003). Outras variações foram inseridas no ensaio, como a adição de enzimas específicas, permitindo que danos como incorporações erradas de uracila, sítios de reparo, ligações cruzadas e outros fossem detectados pelo método (GONTIJO; TICE, 2003).

As células selecionadas para o ensaio do cometa são depositadas numa lâmina com agarose, a membrana é rompida por detergentes e as proteínas nucleares são extraídas por elevada concentração de sais. O DNA das células, devido a sua estrutura, permanece na lâmina como um nucleóide. Em seguida, o material genético é exposto a uma corrente elétrica e conforme o dano, a migração ocorrerá em menor ou maior distância e intensidade. Ao final do ensaio, as lâminas são coradas e as células analisadas em microscopia de fluorescência. A avaliação do dano pode ser quantificada visualmente de acordo com a migração da cauda ou através de análise computacional, podendo analisar parâmetros como tamanho ou intensidade da cauda e *tail moment* (TICE et al., 2000; GONTIJO; TICE, 2003).

1.4.2 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O ensaio de mutagenicidade empregando *Salmonella typhimurium*, também conhecido como teste de Ames, é capaz de detectar mutações gênicas, dentre essas, podemos destacar as substituições e as adições ou deleções de base. Esse ensaio é mundialmente utilizado para determinação do potencial mutagênico de novas drogas e substâncias químicas, devido a sua rápida resposta. Além da curta duração, o ensaio possui alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (61% de acordo com o último estudo

realizado pelo *National Toxicology Program* para 446 compostos) (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004). Esse ensaio também é bastante empregado para amostras ambientais, como ar, água, resíduos, solos e sedimentos (JARVIS et al., 1996).

As linhagens de *Salmonella* utilizadas no teste de Ames pertencem ao grupo de Enterobacterias capazes de produzir azo e nitroredutases (UMBUZEIRO et al., 2005). Essas linhagens apresentam mutações nos genes responsáveis pela biossíntese de histidina e consequentemente não conseguem sintetizar esse aminoácido. Dessa forma, outra mutação é necessária para que as bactérias consigam crescer na ausência do referido aminoácido. Esse evento ocorre quando os organismos são expostos a agentes mutagênicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Cada linhagem apresenta sensibilidade específica para classes de mutágenos. Desse modo, a combinação delas permite identificar diversos agentes que podem interagir com o DNA (BENIGNI; BOSSA, 2011). As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para a triagem de amostras e são capazes de detectar compostos que causam deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de base, respectivamente. As linhagens YG1041 e YG1042 são derivadas das linhagens TA98 e TA100, respectivamente, e apresentam elevada quantidade das enzimas nitro e acetiltransferase, aumentando a sensibilidade para derivados nitro de compostos orgânicos (HAGIWARA et al., 1993).

Algumas substâncias precisam ser metabolizadas para apresentarem atividade mutagênica. Em humanos e animais superiores o sistema de oxidação metabólica citocromo P450 é capaz de biotransformar diversos compostos, que por sua vez, podem reagir com o DNA. Contudo, bactérias não possuem essa capacidade metabólica. Logo, é importante mimetizar esse sistema nos ensaios com bactérias, através da adição de sistema de metabolização exógena (mistura S9) (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Cada linhagem de *Salmonella typhimurium* apresenta diferentes características genéticas. As linhagens selecionadas neste estudo estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas nos ensaios de mutagenicidade deste trabalho

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	hisD3052 ¹ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵	Deslocamento do quadro de leitura	Maron e Ames (1983)
TA100	hisG46 ⁶ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵	Substituição de pares de base	Maron e Ames (1983)
YG1041	hisD3052 ¹ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵ ; alta produção de nitroreductase e acetiltransferase (pYG233) (Cn ^r) ⁷	Deslocamento do quadro de leitura	Hagiwara et al. (1993)
YG1042	hisG46 ⁶ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵ ; alta produção de nitroreductase e acetiltransferase (pYG233) (Cn ^r) ⁷	Substituição de pares de base	Hagiwara et al. (1993)
¹ mutação responsável pela síntese de histidina ² permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos ³ dependência à biotina		⁴ deleção do gene uvrB ⁵ resistência a ampicilina ⁶ mutação responsável pela síntese de histidina ⁷ resistência a canamicina	

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Os objetivos do trabalho foram avaliar a eco e genotoxicidade dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ecotoxicidade aguda dos corantes empregando os bioensaios com o microcrustáceo *Daphnia similis* e com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*;
- Avaliar a toxicidade crônica dos corantes empregando *Ceriodaphnia dubia* como organismo teste;
- Avaliar se o metal cobre presente na estrutura do corante Reactive Blue 15, é capaz de bioacumular em *Ceriodaphnia dubia* após o período de exposição de sete dias ao corante metálico;
- Avaliar a genotoxicidade dos corantes têxteis pelo ensaio do Cometa com células de fibroblasto de derme humana e
- Avaliar a mutagenicidade dos corantes empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, YG1041 e YG1042, na presença e ausência de sistema exógeno de metabolização.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes de toxicidade aguda e crônica com *Daphnia similis*, *Vibrio fischeri* e *Ceriodaphnia dubia* foram realizados em parceria com o Setor de Laboratórios de Ribeirão Preto da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) sob supervisão de Eduardo Angelino Savazzi e alguns ensaios de mutagenicidade foram realizados no Setor de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental da CETESB de São Paulo sob supervisão de Célia Maria Rech e Deborah Arnsdorff Roubicek.

3.1 Corantes estudados

Neste trabalho foram avaliados os corantes têxteis Reactive Blue 4 (RB 4) e Reactive Blue 15 (RB 15). Ambos foram adquiridos da Sigma-Aldrich e suas características estão descritas abaixo:

- Reactive Blue 4

Sinonímia: 1-Amino-4-[3-(4,6-dichlorotriazin-2-ylamino)-4-sulfophenylamino]anthraquinone-2-sulfonic acid, Procion®blue MX-R

Fórmula Molecular: $C_{23}H_{14}Cl_2N_6S_2O_8$

Peso molecular: 637,43 g/mol

Pureza: 35%

Número CAS: 13324-20-4

Grupo Cromóforo: Antraquinona

Método de fixação a fibra têxtil: Reativo

- Reactive Blue 15

Sinonímia: Turquoise Blue

Fórmula Molecular: $C_{41}H_{19}N_{14}Na_4S_5ClCuO_{14}$

Peso molecular: 1282,96 g/mol

Pureza: 35%

Número CAS: 12225-39-7

Grupo Cromóforo: Cobreftalocianina

Método de fixação a fibra têxtil: Reativo

3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os ensaios foram realizados segundo a Norma ABNT NBR12713:2009 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2009).

3.2.1 Soluções utilizadas

- Água de cultivo e diluição - Meio MS (KEATING, 1985)

Esse meio foi preparado adicionando-se para cada litro de água ultrapura 5,00 mL das soluções estoque 1 e 2; 4,00 mL da solução estoque 4 e 1,00 mL das soluções estoque 3, 5, 6 e 7.

- ✓ Solução estoque 1:

10,00 g de nitrato de sódio (NaNO_3), 1,7183 g de silicato de sódio (Na_2SiO_3), 1,8125 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e 2,00 g de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) foram dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

- ✓ Solução estoque 2:

2,00 g de cloreto de potássio (KCl) e 5,1455 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

- ✓ Solução estoque 3

24,4769 g de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 500,00 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

- ✓ Solução 4

2,50 g de EDTA; 2,80 g ácido bórico (H_3BO_3), 0,5803 g de cloreto de ferro anidro (FeCl_3); 0,36 g de cloreto de manganês tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 0,3035 g de cloreto de lítio (LiCl); 0,071 g de cloreto de rubídio (RbCl); 0,1517 g de cloreto de estrôncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); 0,0321 g de brometo de sódio (NaBr); 0,063 g de molibdato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,0336 g de cloreto de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,026 g de cloreto de zinco (ZnCl_2); 0,0101 g de cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 0,0033 g de iodeto de potássio (KI) foram dissolvidos em 2.000 mL de água ultrapura. A solução foi armazenada em frasco âmbar por até 1 mês a 4 °C.

- ✓ Solução 5

0,0014 g de dióxido de selênio (SeO_2) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida por até 1 mês a 4 °C.

✓ Solução 6

0,0011 g metavanadato de amônio (NH_4VO_3) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida a 4 °C por até 1 ano.

✓ Solução 7

0,0010 g de cianocobalamina (Vitamina B_{12}) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi congelada por até 15 dias e descongelada apenas no momento de preparo do meio MS.

O meio MS foi aerado por 24 horas após o preparo para homogeneização. Em seguida, o pH e dureza foram mensurados, sendo que os mesmos deveriam seguir o padrão abaixo:

- pH: entre 7,00 e 7,60
- Dureza: entre 40 e 48 mg CaCO_3/L

Depois do período de 24 horas de aeração, a viabilidade de meio de cultivo MS foi avaliada, expondo neonatas ao meio por 48 horas, sem alimento e iluminação. A água de cultivo foi utilizada quando a imobilidade nos organismos não excedeu 10%.

3.2.2 Manutenção dos organismos teste

Os organismos teste foram obtidos de uma cultura de *Daphnia similis* do laboratório da CETESB de Ribeirão Preto. Eles foram cultivados em meio MS, alimentados diariamente com $3,2 \times 10^6$ células da alga *Pseudokirchneriella subcapita* e 0,02 mL de solução de ração para peixe Tetramin por *Daphnia*/dia. Os organismos foram mantidos em incubadora com fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro) sob a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. A troca do meio de cultivo foi realizada duas vezes por semana e as culturas foram mantidas no laboratório até a idade de 28 dias. Semanalmente, uma nova cultura de *Daphnia* foi iniciada com neonatas, organismos com idade entre 6 e 24 horas, oriundas de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias.

3.2.3 Teste de sensibilidade ao cloreto de potássio

A sensibilidade das culturas de *Daphnia similis* foi avaliada mensalmente com cloreto de potássio (KCl), empregando neonatas. Nesse ensaio, os organismos foram expostos ao sal nas concentrações estabelecidas pela Cetesb de 370; 480; 620; 800 e 1000 mg/L e um controle negativo, meio MS. Cada concentração foi testada em quadruplicata com 5 organismos em cada frasco. Os testes foram incubados por 48 horas, sem iluminação e alimento.

Após a fase de exposição, os indivíduos foram avaliados visualmente quanto à sua mobilidade e foram contabilizados os organismos imóveis, ou seja, incapazes de nadarem após leve agitação da amostra.

O cloreto de potássio foi selecionado como substância de referência devido ao seu baixo risco à saúde humana e ao ambiente comparado com outras substâncias de referência, como dicromato de potássio, sendo essa substância facilmente absorvida pela pele, com potencial carcinogênico e mutagênico e perigoso para o ambiente (ABNT, 2009; ZAGATTO, 2006). Dessa maneira, o cloreto de sódio apresenta vantagens como fácil manuseio e descarte.

3.2.4 Testes de toxicidade com corantes têxteis

Inicialmente foi realizado um teste preliminar com os corantes (dados não apresentados) para determinar a faixa de concentração que causa toxicidade aguda nos organismos. A partir dos resultados observados, foi possível determinar as concentrações dos ensaios definitivos. O corante Reactive Blue 4 foi avaliado nas concentrações de 4,74; 7,11; 10,67; 16,00; 24,00 e 36,00 mg/L e o corante Reactive Blue 15 nas concentrações de 15,00; 30,00; 60,00; 120,00; 240,00 e 480,00 mg/L. Ambos os corantes foram diluídos em meio MS. Neonatas foram expostas a 10 mL de amostra de corantes ou controle negativo (meio MS). Os ensaios foram realizados em quadruplicata, com cinco organismos em cada frasco, incubados por 48 horas, sem iluminação e alimento. Para a validação dos resultados, a porcentagem dos organismos imóveis no controle negativo não pode exceder 10%.

No início e final dos ensaios foram monitorados os valores de pH e oxigênio dissolvido das amostras e controle negativo, pois essas variáveis podem interferir nos resultados.

3.3 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Os ensaios foram realizados segundo a Norma ABNT NBR15411-3 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012) e Norma Técnica CETESB L5.227 (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2001).

3.3.1 Soluções utilizadas

- ✓ Solução de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

0,01 g de sulfato de zinco heptahidratado foi dissolvido em 100,00 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 2% e armazenado em geladeira por 4 meses.

- ✓ Diluente Microtox (Solução de cloreto de sódio 2%)

20,00 g de cloreto de sódio (NaCl) foram dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura. Essa solução foi mantida em refrigerador (2 a 8 °C) por até 1 ano.

- ✓ Solução de ajuste osmótico (SAO)

22,00 g de cloreto de sódio (NaCl) foram dissolvidos em 100,00 ml de água ultrapura. A solução foi mantida em refrigerador (2 a 8 °C) por até 1 ano.

- ✓ Solução de reconstituição

A solução utilizada para reconstituição da bactéria foi fornecida pela empresa Azur Environmental com certificado de qualidade.

3.3.2 Organismo teste

Para o ensaio utilizou-se uma cultura liofilizada da bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*, contendo 10^8 células por ampola, estocadas em freezer (entre -25 e -20 °C).

3.3.3 Teste de sensibilidade ao sulfato de zinco

Os ensaios de toxicidade com sulfato de zinco e com as amostras foram realizados com o equipamento Analisador de Toxicidade Sistema Microtox Modelo 500, Software Microtox Omni (Azur Environmental, USA).

Para avaliar a sensibilidade do organismo teste foi realizado anteriormente às análises das amostras, um ensaio com sulfato de zinco heptahidratado (controle positivo). Inicialmente foram realizadas diluições seriadas com a solução estoque de ZnSO_4 (100 mg/L), resultando em sete diluições. A bactéria foi ressuspensa com a solução de reconstituição e a luminescência foi mensurada antes e após 15 minutos de contato entre o organismo e as diluições do sal. Os resultados foram expressos

em CE₅₀ (Concentração Efetiva da amostra capaz de reduzir 50% da luminescência dos organismos expostos).

3.3.4 Teste de toxicidade com os corantes têxteis

A bactéria foi exposta a nove concentrações do corante, preparadas a partir de diluições seriadas (1:2) com as soluções estoque de RB 4 e RB 15, que foram osmoticamente ajustadas com solução de cloreto de sódio 22% (m/v). A solução de cloreto de sódio 2% (m/v) foi utilizada como controle negativo. O ensaio foi realizado em temperatura constante de 15 °C e empregou-se o protocolo “81,9% Basic Test”, indicado para amostras com baixa toxicidade (AZUR ENIRONMENTAL, 1998). Os corantes foram diluídos em água ultrapura. A luminescência da bactéria foi mensurada antes do contato com os corantes e após 5 e 15 minutos de contato.

Amostras de corantes apresentam coloração acentuada que podem interferir na leitura da luminescência. Portanto, é necessário realizar o procedimento de correção da cor. Nesse ensaio, realizou-se esse método através da leitura da absorvância das amostras em espectrofotômetro e posteriormente inseriu-se esses dados no programa MicrotoxOmni, que corrigiu os valores de luminescência. Os resultados foram expressos em Concentração Efetiva da amostra que causou redução de 20% na luminescência dos organismos após quinze minutos de exposição.

Os valores de pH da amostra também podem interferir no resultado, valores entre 6,0 e 8,5 não necessitam de correção. Contudo, valores abaixo ou acima destes devem ser ajustados para $7 \pm 0,2$ com adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Para validação dos resultados de toxicidade das amostras e controle positivo é necessário que o valor do fator de correção (empregado para correção dos valores de luminescência) seja igual ou maior que 0,7 e CE₅₀ do sulfato de zinco (controle positivo) esteja dentro da faixa de 3,00 a 10,00 mg/L (ABNT, 2012; CETESB, 2001).

3.4 Ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*

Os ensaios foram realizados segundo a Norma ABNT NBR 13373:2010 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2010)

3.4.1 Organismo teste

Os organismos teste foram obtidos de uma cultura de *Ceriodaphnia dubia* do laboratório da CETESB de Ribeirão Preto. Eles foram cultivados em água natural, alimentados diariamente com alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e ração para peixe Tetramin. O meio de cultivo foi renovado três vezes por semana e as culturas foram mantidas no laboratório até a idade de 21 dias. Semanalmente, uma nova cultura de *Ceriodaphnia* foi iniciada, com neonatas oriundas de fêmeas com idade entre 7 e 21 dias.

3.4.2 Meio de cultivo

O meio de cultivo adotado para *Ceriodaphnia dubia* foi água natural coletada em Cachoeira de Emas, SP, Brasil (21°55'36" de latitude sul e 47°22'15" de longitude oeste) conforme estabelecido pela Cetesb de Ribeirão Preto. Após a coleta, a água foi filtrada em rede de plâncton e os parâmetros pH e dureza foram ajustados, sendo que esses parâmetros finais deveriam estar compreendidos entre:

- pH: entre 7,00 e 7,60
- Dureza: entre 40 e 48 mg CaCO₃/L

A viabilidade do meio de cultivo também foi avaliada como descrito anteriormente para *Daphnia similis*.

3.4.3 Teste de sensibilidade ao cloreto de sódio

Mensalmente a sensibilidade dos organismos foi avaliada empregando cloreto de sódio (NaCl) como substância de referência. Nesse ensaio, as neonatas foram expostas ao sal nas concentrações de 250; 500; 1000 e 2000 mg/L e à água natural de cultivo (controle negativo). Para cada concentração foram preparadas 10 replicatas com um indivíduo em cada frasco, mantidos em incubadoras por sete dias, com fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro) e temperatura de 25±2°C. A renovação da solução teste foi realizada a cada 2 dias e os organismos foram alimentados diariamente. Durante a renovação da solução teste, o número de neonatas produzidas e de organismos mortos foram contabilizados. Os testes foram considerados válidos quando a mortalidade dos organismos adultos no controle não excedeu 20% e quando 60% ou mais das fêmeas adultas do controle negativo produziram no mínimo 15 neonatas até o oitavo dia (ABNT, 2010).

3.4.4 Testes de toxicidade com corantes têxteis

Primeiramente foi realizado um teste preliminar com os corantes a fim de determinar as concentrações que causam efeitos subletais (dados não apresentados). Os corantes foram diluídos em água natural de cultivo.

O corante Reactive Blue 4 foi testado nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 e 20,00 mg/L, ao passo que, o corante Reactive Blue 15 foi avaliado nas concentrações de 1,25; 2,50; 5,00; 10,00; 20,00 e 40,00 mg/L.

Neonatas foram expostas a 15 mL de amostra de corantes ou controle negativo (água natural de cultivo). Para cada concentração e controle foram preparadas 10 réplicas com um organismo em cada frasco, incubados por 7 dias, com fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro), alimentação diária (alga e ração) e renovação da solução teste ou água natural a cada 2 dias. Durante a renovação, o número de neonatas produzidas e de organismos mortos foram contabilizados.

A validação dos ensaios foi realizada como descrito anteriormente no teste de sensibilidade com *Ceriodaphnia dubia*.

3.5 Quantificação de cobre em *Ceriodaphnia dubia*

A quantificação de cobre nos organismos e soluções teste (água de cultivo e corante) foi realizada em parceria com o Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior.

A determinação dos valores do metal foi realizada empregando espectrofotometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Após o período de exposição aos corantes, 7 dias, os organismos de cada concentração foram colocados em tubos de fundo cônico de 15,00 mL. Adicionou-se 100,00 µL de ácido nítrico para digestão das amostras e posteriormente completou-se o volume para 5,00 mL. Em seguida, foi realizada a leitura das amostras no ICP-MS. A concentração de cobre nos organismos e soluções foi mensurada em ng/mL. Para as amostras de *C. dubia*, esse valor foi convertido em ng de cobre/organismo para facilitar a interpretação dos dados. O ródio foi utilizado com padrão interno.

3.6 Teste de genotoxicidade Cometa

3.6.1 Soluções utilizadas

✓ Meio de cultivo celular

O meio de cultivo FBM (*Fibroblast Basal Medium*) foi acrescido de insulina, gentamicina/anfoteromicina, fator de crescimento para fibroblasto humano (hFGF-B) e soro bovino fetal, sendo que os três primeiros compostos foram adicionados na proporção de 0,1% e o último na proporção de 10%.

✓ Tampão fosfato salino (PBS)

Em balão volumétrico, foram dissolvidos 0,20 g de cloreto de potássio (KCl), 0,20 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 8,00 g de cloreto de sódio (NaCl) e 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4) em água destilada qsp 1.000 mL, agitou-se até completa solubilização. Posteriormente, o pH foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e a solução foi autoclavada por 30 minutos a 120 °C.

✓ Tripsina

A tripsina é uma enzima proteolítica, capaz de desprender as células aderidas ao frasco de cultura por meio da degradação da matriz glicoprotéica celular. Para o preparo, foram misturados, em capela de fluxo, 10,00 mL de tripsina e 90,00 mL de PBS estéril.

✓ Agarose Normal 1,5%

3,30 g de agarose (*Ultra Pure™ Agarose Invitrogen*) foram dissolvidos em 220,00 mL de PBS diluído (10X), aquecidos em microondas até completa solubilização e posteriormente, colocados em banho maria a 60 °C para estabilização. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas na solução e secas em temperatura ambiente.

✓ Agarose LMP 0,5% (baixo ponto de fusão)

250,00 mg de agarose LMP (*Low Melting Point Invitrogen*) foram dissolvidos em 50,00 mL de PBS diluído (10X) e aquecido em microondas. Aliquotou-se em frascos de penicilina de 5,00 mL e armazenou-se em geladeira. No momento de uso, a solução foi derretida em microondas e estabilizada em banho maria a 37 °C.

✓ Solução de lise (estoque)

233,70 g de cloreto de sódio (NaCl), 59,52 g de EDTA e 1,92 g de Tris foram dissolvidos em qsp 1.600 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 10 com hidróxido de sódio. Esta solução foi preparada no dia do ensaio, bem como a solução de lise (uso).

✓ Solução de lise (uso)

Homogeneizou-se 40,00 mL de DMSO, 4,00 mL de Triton X-100 e 356,00 mL da solução de lise estoque.

✓ Solução de EDTA 200 mM (Solução A)

3,72 g de EDTA foram solubilizados em 50,00 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 10 com hidróxido de sódio. Essa solução pode ser armazenada por até 2 semanas na geladeira ao abrigo da luz.

✓ Solução de hidróxido de sódio (Solução B)

100,00 g de hidróxido de sódio foram dissolvidos em qsp 250,00 mL de água destilada. Essa solução foi preparada em capela de exaustão e armazenada em frasco plástico resistente por até 2 semanas na geladeira.

✓ Solução de eletroforese

Essa solução foi preparada no momento do ensaio. Homogeneizou-se 10,00 mL da solução A, 60,00 mL da solução B e 1.930 mL de água destilada gelada. O pH desta solução deve ser maior que 13.

✓ Solução de neutralização

77,60 g de Tris (hidroximetil) aminometano foram dissolvidos em 1.400 mL de água destilada. Após completa solubilização, o pH foi ajustado para 7,5 com HCl e o volume ajustado para 1.600 mL. Essa solução pode ser armazenada por até 2 semanas em geladeira.

✓ Solução de coloração (20µg/mL)

10,00 µL da solução de brometo de etídio (10,00 mg/mL-Invitrogen) foram diluídos em 4.990 µL de água destilada. Essa solução foi conservada ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

O brometo de etídio é um agente mutagênico e carcinogênico, capaz de intercalar na estrutura do DNA. Logo, o manuseio deve ser feito com muito cuidado (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008).

3.6.2 Cultura de fibroblastos de derme humana adulta

3.6.2.1 Cultura inicial e congelamento das células

As células foram obtidas da empresa Lonza (nº catálogo: CC 2511) e mantidas em meio FBM, acrescido de suplementos e fatores de crescimento em atmosfera contendo 5% CO₂ e 96% de umidade a 37 °C. Alíquotas da cultura celular

foram congeladas com solução de dimetilsulfóxido e soro bovino fetal (10% DMSO e 90% SBF) e mantidas em nitrogênio líquido.

3.6.2.2 Descongelamento das células

No período dos ensaios, as células foram descongeladas. Inicialmente, as células foram removidas do nitrogênio líquido e ressuspensas com 1,00 mL de meio de cultivo a 37 °C. Posteriormente, este conteúdo foi transferido para uma garrafa de cultura (75 cm²) com 14,00 mL de meio FBM. O frasco foi colocado na estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

3.6.2.3 Repique e manutenção das células

Para a manutenção da cultura celular, o meio de cultivo das garrafas de cultura foi descartado e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS). Posteriormente, adicionou-se tripsina para o desprendimento das células da parede do frasco. Acrescentou-se meio de cultivo e centrifugou-se todo o conteúdo a 1.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido com 1,00 mL de meio de cultivo. Em seguida, o volume foi dividido e colocado em 2 novos frascos de cultura celular e os mesmos foram acomodadas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

3.6.2.4 Procedimento para o teste do Cometa

No dia do ensaio, as células foram contabilizadas em câmara de *Newbauer* para obter-se a quantidade adequada para a realização do teste. Os ensaios foram realizados segundo o protocolo estabelecido por Tice et al. (2000) com modificações.

Inicialmente, em cada poço da placa de cultura de células foram colocados $2,0 \times 10^5$ fibroblastos e incubados por 24 horas a 37 °C. Após este período, as células foram expostas às soluções de corantes por 3 horas. Foram analisadas sete concentrações para cada corante, sendo essas: 0,0005; 0,005; 0,05; 0,50; 5,00; 50,00 e 500,00 µg/mL, além dos controles negativo (tampão fosfato salino-PBS) e positivo (peróxido de hidrogênio 60,00 µM). Os corantes foram diluídos em tampão fosfato (PBS). Ao final do tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o sobrenadante foi descartado.

Foram homogeneizados 60,00 µL de suspensão celular com 200,00 µL de agarose de baixo ponto de fusão. Na sequência, cerca de 70,00 µL dessa mistura foram distribuídos nas lâminas com agarose. As lâminas foram recobertas com lamínula e colocadas na geladeira por 15 minutos. Após este período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas na solução de lise por 2 horas.

Na etapa seguinte, as lâminas foram transferidas para a solução de eletroforese por 20 minutos e em seguida iniciou-se corrida eletroforética por 20 minutos (300mA e 25V). Posteriormente, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização e fixadas com etanol absoluto. No momento de leitura das lâminas, elas foram coradas com brometo de etídio (20,00 µg/ml) e examinadas em microscópio de fluorescência com o software Comet IV. Os resultados foram mensurados empregando-se o *tail moment*, produto da quantidade de DNA na cauda e a média da distância de migração na cauda (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990). Foram analisadas 100 células, distribuídas igualmente em 2 lâminas. Realizou-se três repetições para esse ensaio.

O parâmetro escolhido para avaliar a genotoxicidade, *tail moment*, tem sido sugerido e muito utilizado como um índice para avaliação do dano ao DNA, uma vez que considera tanto a migração do material genético quanto a quantidade desse material na cauda (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990; HELLMAN; VAGHEF; BOSTROM, 1995; GARAJ-VRHOVAC; OREŠČANIN, 2009; VALVERDE; ROJAS, 2009).

3.6.2.5 Teste de viabilidade celular

Uma alíquota da suspensão celular foi utilizada para avaliação da viabilidade empregando o método de exclusão por Azul de Tripán, garantindo o uso de células viáveis no ensaio (TICE et al., 2000). Para isso, foram homogeneizados 20,00 µL de suspensão celular e 20,00 µL de Azul de Tripán. Posteriormente, uma fração foi utilizada para preencher a câmara de *Newbauer*. Foram avaliadas 100 células de cada concentração em microscópio óptico e a porcentagem de células viáveis foi determinada.

As células viáveis apresentam membranas intactas e não permitem a entrada do corante na célula, ao passo que, as células inviáveis, que não apresentam membrana celular íntegra, permitem a incorporação do corante. Desta forma, as

células inviáveis coram-se de azul e as viáveis permanecem transparentes (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

3.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

A atividade mutagênica foi avaliada pelo ensaio *Salmonella*/microsoma empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, YG1041 e YG1042. As amostras de corantes foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS) e as concentrações variaram entre 0,50 e 5.000 µg/placa, baseado em ensaios preliminares (dados não apresentados).

Os testes foram realizados de acordo com o protocolo de pré incubação, na presença e ausência de ativação metabólica exógena (mistura S9) (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Essa solução, é constituída por um homogenato de células de fígado de rato pré tratado com a mistura de bifenilas policlorinadas (Aroclor 1254), que induz um aumento das enzimas (P450) neste órgão, e cofatores necessários (MARON; AMES, 1983).

3.7.1 Soluções utilizadas

✓ Solução de Agar

15,00 g de bacto agar foram dissolvidos em 780,00 mL de água destilada. Essa solução foi autoclavada e estabilizada em banho maria a 55 °C. A solução deve ser preparada no dia do ensaio e não pode ser estocada.

✓ Solução de glicose

20,00 g de glicose foram dissolvidos em qsp 200,00 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estabilizada em banho maria a 55 °C. Essa solução deve ser preparada no dia do ensaio e não pode ser estocada.

✓ Solução de Vogel Bonner

10,00 g de sulfato de magnésio pentahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 91,43 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 500,00 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 175,00 g de fosfato de sódio e amônio tetra hidratado ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em qsp 1.000 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estabilizada em banho maria a 55 °C. Essa solução pode ser armazenada por até 6 meses em geladeira ao abrigo da luz.

✓ Solução de biotidina

0,0122 g de D-biotina (MM=244,3 mol/L) e 0,0078 g de L-histidina (MM=155 mol/L) foram dissolvidos em 100,00 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estabilizada em banho maria a 55 °C. Essa solução pode ser armazenada por até 80 dias em geladeira ao abrigo da luz.

✓ Agar mínimo

Este meio de cultura é composto por 780,00 mL de solução de agar, 200,00 mL de solução de glicose, 20,00 mL de solução de Vogel Bonner e 12,00 mL de solução de biotidina. Foram distribuídos 20,00 mL desse meio em cada placa de Petri estéril utilizada no ensaio.

✓ Agar de superfície (Top agar)

3,00 g de bacto agar e 2,50 g de cloreto de sódio (NaCl) foram dissolvidos em 500,00 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave.

✓ Caldo nutriente

2,50 g de nutriente Broth nº 2 (Oxoid) foram dissolvidos em 100,00 mL de água destilada, distribuídos em volumes de 20,00 mL e esterilizados em autoclave.

✓ Solução de fosfato de sódio dibásico (Solução A)

28,40 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) foram dissolvidos em qsp 1.000 mL de água destilada.

✓ Solução de fosfato de sódio monobásico (Solução B)

27,60 g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em qsp 1.000 mL de água destilada.

✓ Tampão fosfato 0,2 M

O tampão fosfato é constituído de 880,00 mL de solução A e 120,00 mL de solução B. O pH foi ajustado para 7,4 e esterilizado em autoclave. Esse tampão pode ser armazenado por até 2 meses em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

✓ NADP 0,1 M

0,7654 g de NADP (β nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) foram solubilizados em 10,00 mL de água destilada estéril, filtrados em membrana de 0,22 μm e armazenada em frasco autoclavado. Essa solução pode ser estocada em freezer (-20 °C) por até 2 meses.

✓ Glicose 6 fosfato 1M

2,821 g de glicose 6 fosfato foram dissolvidos em 10,00 mL de água destilada, filtrados em membrana de 0,22 μm e armazenado em frasco autoclavado. Essa solução pode ser estocada em freezer (-20 °C) por até 2 meses.

✓ Solução de sais

8,13 g de cloreto de magnésio (MgCl_2) e 12,30 g de cloreto de potássio (KCl) foram dissolvidos em qsp 100,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave. Essa solução pode ser armazenada em geladeira por até 4 meses.

✓ Fração S9

Esse reagente é adquirido liofilizado e congelado. No momento de uso, o mesmo foi ressuspensionado com 2,10 mL de água destilada estéril.

✓ Mistura S9

A mistura S9 é constituída por 39,50 mL de água destilada estéril, 50,00 mL de tampão fosfato 0,2 M, 4,00 mL de NADP 0,1 M, 0,50 mL de glicose 6 fosfato 1 M, 2,00 mL de solução de sais e 4,00 mL de fração S9. Essa solução foi preparada em ambiente asséptico.

✓ Agar nutriente

25,00 g de nutriente Broth nº2 (Oxoid) e 15,00 g de bacto agar foram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave, estabilizado em banho maria a 55 °C. Foram distribuídos 20,00 mL desse meio em cada placa de Petri estéril utilizada no ensaio.

✓ Solução de fosfato de potássio monobásico (Solução C)

34,00 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram dissolvidos em qsp 1.000 mL de água destilada.

✓ Solução de cloreto de magnésio (Solução D)

81,10 g de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em qsp 1.000 mL de água destilada.

✓ Água de diluição

A água de diluição é composta por 1,25 mL de solução C, 5,00 mL de solução D e 993,75 mL de água destilada. Foram distribuídos 90,00 mL dessa solução em frascos de vidro e esterilizados em autoclave.

3.7.2 Procedimento para o ensaio de mutagenicidade

As linhagens de *Salmonella* foram mantidas em freezer (-70 °C). No dia do ensaio, foram descongeladas, inoculadas no caldo nutriente e mantidas *overnight* a 37 °C sob agitação de 150 a 170 rpm. Após o período de crescimento, as culturas foram mantidas na geladeira até o momento de uso.

100,00 µL da cultura bacteriana de *Salmonella typhimurium*, 500,00 µL de tampão fosfato de sódio 0,2M (para ensaio na ausência de ativação metabólica) ou mistura S9 (para ensaio na presença de ativação metabólica) e 100,00 µL de solução de corante foram introduzidos em tubos de vidro e incubados por 30 minutos a 37°C. Após incubação, foram adicionados 2,00 mL de top agar em cada tubo que foram vertidos em placa contendo agar mínimo. As placas foram incubadas invertidas por 66 horas a 37°C.

O tampão PBS (100,00 uL) foi utilizado como controle negativo em todas as condições testadas. Para as linhagens TA98 e TA100 na ausência de S9 o controle positivo foi óxido de 4 nitroquinolina (0,05 µg/µL) e na presença de ativação metabólica foi o 2 aminoantraceno (0,25 µg/µL). Para a linhagem YG1041 foi utilizado o 4 nitro orto fenilenodiamina (1,00 µg/µL) e 2 aminoantraceno (0,00625 µg/µL) na ausência e presença de S9, respectivamente. E finalmente, para YG1042 utilizou-se 2 nitrofluoreno (1,00 µg/µL) e 2 aminoantraceno (0,25 µg/µL) na ausência e presença de S9, respectivamente.

Ao final do ensaio, o número de colônias foi contabilizado. O teste de viabilidade foi realizado em paralelo com os ensaios de mutagenicidade.

3.7.3 Avaliação da viabilidade

A viabilidade das culturas de *Salmonella typhimurium* foi avaliada em todos os ensaios de mutagenicidade. Para esse teste, foram aliquoteados 100 µL da cultura bacteriana e descartados no frasco com 90 mL de água de diluição. Essa solução foi homogeneizada vigorosamente, retirados 100,00 µL e transferidos para um novo frasco com 90,00 mL de água de diluição. Agitou-se continuamente e retirou-se 100 uL, sendo esse volume, descartado em placas de Petri com agar nutriente e espalhados com auxílio de alça de Drigalski e próximo a chama de fogo. As placas foram incubadas invertidas, a 37 °C por 24 horas. Ao final, a densidade da cultura deveria estar contida entre $1,0-2,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

3.8 Análise estatística

No ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, a concentração efetiva que causou imobilidade em 50% dos organismos expostos, CE₅₀ 48 h, foi calculada através do método estatístico Trimmed Spearman – Karber com um intervalo de

confiança de 95% e os resultados foram expressos em mg/L (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

Os dados obtidos no ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* foram analisados no software Microtox Omni e os resultados expressos em % de inibição da bioluminescência e Concentração Efetiva que causa 50% e 20% de inibição da luminescência após quinze minutos de exposição, para o sulfato de zinco (controle positivo) e amostras de corantes, respectivamente.

Para o ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, os resultados foram analisados no programa TOXSTAT 3.5 (WEST INC; GULLEY, 1995) para determinação de CENO (Concentração mais elevada da amostra em que não se observa efeito estatisticamente significativo comparado ao controle) e CEO (Concentração mais baixa da amostra que se observa efeitos significativos comparado ao controle). Nesse método, empregou-se ANOVA e teste estatístico Dunnett ($p < 0,05$). Os resultados também foram avaliados pelo método de interpolação linear, empregando o programa ICPIN (NORBERG-KING, 1993) para determinar a concentração capaz de inibir 25 e 50% da reprodução nos organismos expostos (CI_{25} e CI_{50} , respectivamente). Adicionalmente, os dados foram analisados por ANOVA e o teste estatístico Scott-Knott, para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre a fecundidade observada no controle negativo e nos diferentes tratamentos com os corantes têxteis ($p < 0,05$) (SCOTT; KNOTT, 1974).

Os resultados obtidos na análise de cobre em *Ceriodaphnia dubia* foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) empregando o programa estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

Os dados obtidos no ensaio do Cometa com fibroblastos foram estatisticamente avaliados por ANOVA e teste de Dunnett ($p < 0,05$) empregando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.

Para os ensaios de mutagenicidade com *Salmonella*, os resultados foram expressos em média do número de revertentes por placa $\pm$ desvio padrão e potência mutagênica quando as amostras foram positivas. A potência é obtida através da inclinação da reta no gráfico, empregando o software Salanal. Esse software emprega o modelo Bernstein, que por sua vez, utiliza ANOVA e regressão linear na análise dos dados (BERSTEIN et al., 1982; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Toxicidade aguda com *Daphnia similis*

4.1.1 Teste de sensibilidade ao cloreto de potássio

A sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de potássio (KCl) foi avaliada mensalmente. As concentrações do sal que causaram imobilidade em 50% dos organismos expostos (CE_{50}) nos meses dos ensaios com os corantes estão representadas na Tabela 2. Os testes 1, 2, 3, 4 e 5 representam os meses de outubro, novembro, dezembro, janeiro e fevereiro de 2011 e 2012, respectivamente.

Tabela 2. Concentração de cloreto de potássio (KCl) que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos (*Daphnia similis*) ao sal por 48 horas sem iluminação e alimento nos ensaios de sensibilidade realizados no período dos testes de toxicidade aguda com os corantes

Cloreto de Potássio (KCl)		
Teste	CE_{50} 48h (mg/L)	Intervalo de confiança (95%)
1	735,04	685,15-788,56
2	774,29	730,14-821,12
3	678,53	642,77-716,28
4	788,77	735,01-846,47
5	792,27	743,74-843,96
Média $\pm$ Desvio Padrão: 753,78 mg/L $\pm$ 47,80		
Faixa de Sensibilidade (mg/L): 642,77-846,47		

Esses valores estavam compreendidos num intervalo de ± 2 desvios padrão em relação aos valores médios da carta controle obtidos para a mesma espécie em testes realizados pela CETESB em meses anteriores. Logo, a sensibilidade dos organismos estava dentro da faixa de aceitação para a realização dos ensaios com os corantes.

4.1.2 Testes de toxicidade com os corantes têxteis

Nos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis*, o corante RB 4 foi cerca de 20 vezes mais tóxico que o corante RB 15, induzindo a imobilidade nos organismos

Os valores de pH e oxigênio dissolvido (OD) das amostras não interferiram na toxicidade dos corantes, pois todos os valores monitorados no início e final dos testes estavam dentro dos valores estabelecidos pelas normas técnicas.

4.2 Toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

4.2.1 Teste de sensibilidade ao sulfato de zinco

O sulfato de zinco foi utilizado como substância de referência nos ensaios com *Vibrio fischeri*. Todos os valores obtidos no período dos ensaios apresentaram-se dentro da faixa de aceitação (3,00-10,00 mg/L) e a média da sensibilidade foi 4,653 mg/L (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de CE_{50} obtidos nos ensaios de sensibilidade com *Vibrio fischeri* após exposição ao sulfato de zinco por 15 minutos

Sulfato de Zinco Heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)		
Teste	CE_{50} 15' (mg/L)	Intervalo de Confiança
1	4,481	3,015-6,660
2	4,928	3,420-7,101
3	4,514	3,653-5,578
4	4,689	3,302-6,658
Média $\pm$ Desvio Padrão: 4,653 mg/L $\pm$ 0,2048		
Faixa de Sensibilidade (mg/L): 3,015-7,101		

4.2.2 Testes de toxicidade com os corantes têxteis

As soluções de corantes RB 4 e RB 15 apresentaram valores de pH igual a 4,02 e 5,69, respectivamente. Para fins de comparação, decidimos realizar os ensaios com as amostras sem ajuste de pH. No entanto, sabendo-se que esse parâmetro pode interferir nos resultados, avaliou-se também a toxicidade das amostras com ajuste de pH. Para este segundo ensaio, utilizou-se soluções de corantes mais concentradas com pH inicial igual a 4,02 (RB 4) e 5,77 (RB 15). Após ajuste com hidróxido de sódio, o pH passou para 6,90 e 7,00 para os corantes RB 4 e RB 15, respectivamente.

Neste ensaio, o corante RB 4 também foi mais tóxico comparado ao corante RB 15, apresentando valores de CE_{20} 15' de 100,20 e 132,30 mg/L, nos ensaios sem e com ajuste de pH, respectivamente (Figuras 2 e 3). Já o corante RB 15 apresentou CE_{20} 15' de 350,04 mg/L sem ajuste de pH e 454,37 mg/L com ajuste de pH (Figuras 4 e 5).

Figura 2. Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 4 sem ajuste de pH

Figura 3. Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 4 com ajuste de pH

Figura 4. Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 15 sem ajuste de pH

Figura 5. Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Reactive Blue 15 com ajuste de pH

Os valores de CE_{50} (mg/L) encontrados nesse ensaio para o corante RB 4 foram de 319,26 (272,22-374,46) e 584,82 (430,38-794,88), sem e com ajuste de pH, respectivamente. Para o corante RB 15 os valores foram de 2.385,6 (1.733,8-3.282,8) e 18.886 (11.319-31.514), sem e com ajuste de pH, respectivamente.

Todos os ensaios realizados apresentaram valores de fator de correção maior que 0,7 e CE_{50} para o sulfato de zinco (controle positivo) dentro da faixa de 3,00 a 10,00 mg/L. Logo, todos os resultados foram validados.

4.3 Toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*

4.3.1 Teste de sensibilidade ao cloreto de sódio

A sensibilidade dos organismos no período do ensaio foi mensurada e a concentração de cloreto de sódio que causou redução de 50% na reprodução após sete dias de exposição foi de 1161,90 e 1398,06 mg/L para os meses de janeiro e março de 2013, respectivamente. Esses valores foram inseridos na carta controle, que ainda está em fase de elaboração pela CETESB.

4.3.2 Testes de toxicidade crônica com os corantes têxteis

O corante Reactive Blue 4 reduziu a fecundidade apenas na maior concentração (20,00 mg/L). Nas demais concentrações avaliadas foi observado aumento no número de filhotes produzidos pelos organismos. A Figura 6 representa a média e desvio padrão de 3 repetições dos ensaios.

Figura 6. Número médio de neonatas produzidas por jovens de *Ceriodaphnia dubia* após sete dias de exposição ao corante Reactive Blue 4

* $p < 0,05$

O corante Reactive Blue 15 reduziu a fecundidade de *Ceriodaphnia dubia* comparado ao controle negativo (CN). Os resultados das 3 repetições estão representados no Figura 7.

Figura 7. Número médio de neonatas produzidas por jovens de *Ceriodaphnia dubia* após sete dias de exposição ao corante Reactive Blue 15

* $p < 0,05$

Os valores de CENO, CEO, Cl_{25} e Cl_{50} foram determinados para todas as repetições dos testes de toxicidade. Os resultados para o corante RB 4 e RB 15 estão sumarizados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Valores de CENO, CEO, Cl_{25} e Cl_{50} obtidos nos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* exposta ao corante Reactive Blue 4 por 7 dias

REPETIÇÃO	Reactive Blue 4			
	CENO (mg/L)	CEO (mg/L)	Cl_{25} (mg/L)	Cl_{50} (mg/L)
1	10	20	12,05 (9,84-13,58)	15,82 (14,36-17,27)
2	20	> 20	13,87 (9,32-15,86)	19,41 (---)
3	10	20	16,24 (---)	>20 (---)
Média $\pm$ Desvio Padrão			14,05 $\pm$ 2,10	17,62 $\pm$ 2,54

CENO: Concentração de Efeito Não Observado

CEO: Concentração de Efeito Observado

Cl_{25} : Concentração capaz de inibir 25% da reprodução

Cl_{50} : Concentração capaz de inibir 50% da reprodução

---: Valores não determinados

Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança de 95%

Tabela 7. Valores de CENO, CEO, CI_{25} e CI_{50} obtidos nos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* exposta ao corante Reactive Blue 15 por 7 dias

Reactive Blue 15				
REPETIÇÃO	CENO (mg/L)	CEO (mg/L)	CI_{25} (mg/L)	CI_{50} (mg/L)
1	2,5	5	10,65 (3,12-12,65)	17,59 (15,32-19,10)
2	5	10	11,68 (5,23-14,88)	20,45 (17,28-24,20)
3	5	10	12,72 (7,10-18,37)	25,09 (20,75-28,74)
Média ± Desvio Padrão			11,68 ± 1,04	21,04 ± 3,78

CENO: Concentração de Efeito Não Observado

CEO: Concentração de Efeito Observado

CI_{25} : Concentração capaz de inibir 25% da reprodução

CI_{50} : Concentração capaz de inibir 50% da reprodução

Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança de 95%

Na análise dos dados por ANOVA e pelo teste Scott-Knott foi possível identificar os tratamentos que diferiram estatisticamente do controle negativo. Os resultados estão representados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Comparação entre o número médio de neonatas produzidas por adultas de *Ceriodaphnia dubia* no controle negativo (0) e tratamentos com o corante Reactive Blue 4 em três repetições nos ensaios de toxicidade crônica

Reactive Blue 4							
Concentração (mg/L)	0	0,625	1,25	2,50	5,00	10,00	20,00
Média ± desvio padrão	18,53 ± 4,13	20,00 ± 3,78	22,00 ± 2,07*	22,73 ± 1,50*	25,47 ± 1,76*	19,93 ± 2,67	10,23 ± 5,55*

*: estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$)

Tabela 9. Comparação entre o número médio de neonatas produzidas por adultas de *Ceriodaphnia dubia* no controle negativo (0) e tratamentos com o corante Reactive Blue 15 em três repetições nos ensaios de toxicidade crônica

Concentração (mg/L)	Reactive Blue 15						
	0	1,25	2,50	5,00	10,00	20,00	40,00
Média ± desvio padrão	28,00 ± 3,90	25,60 ± 5,51	25,23 ± 4,35	23,83± 1,70	22,03 ± 2,68	14,10 ± 0,92 *	3,37 ± 0,61 *

*: estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$)

4.4 Quantificação de cobre em *Ceriodaphnia dubia*

Os valores de concentração de cobre detectados nos organismos expostos ao corante Reactive Blue 15 foram semelhantes e não houve diferença estatisticamente significativa comparado ao controle negativo (Figura 8).

Figura 8. Concentração de cobre (ng/organismo) em *Ceriodaphnia dubia* expostas por 7 dias a diferentes concentrações de cobre, presente na água de cultivo (controle negativo) e soluções do corante Reactive Blue 15

4.5 Teste de genotoxicidade/ Ensaio do Cometa

Ambos corantes não induziram genotoxicidade em fibroblastos de derme humana em nenhuma das condições testadas, uma vez que, não houve diferença

estatística significativa no *tail moment* encontrado nas amostras e controle negativo. Os resultados estão representados nas Figuras 9 e 10.

Figura 9. *Tail moment* observado no ensaio de genotoxicidade Cometa empregando células de fibroblastos de derme humana expostas ao corante Reactive Blue 4. Os resultados representam a média e desvio padrão de três repetições

*: $p < 0,05$ (estatisticamente diferente do controle negativo)

CN: Controle Negativo (Tampão Fosfato Salino- PBS)

CP: Controle Positivo (H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio 60µM)

Figura 10. *Tail moment* observado no ensaio de genotoxicidade Cometa empregando células de fibroblastos de derme humana expostas ao corante Reactive Blue 15. Os resultados representam a média e desvio padrão de três repetições

*: $p < 0,05$ (estatisticamente diferente do controle negativo)

CN: Controle Negativo (Tampão Fosfato Salino- PBS)

CP: Controle Positivo (H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio 60µM)

É importante salientar que os tratamentos empregados (corantes e controles negativo e positivo) não alteraram a viabilidade das células empregadas nos testes, visualizados a partir do ensaio com Azul de Tripan. Em todos os testes a viabilidade foi superior a 90%.

4.6 Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O corante Reactive Blue 4 induziu mutagenicidade na linhagem TA100 na presença de metabolização exógena (S9), com potência mutagênica de 0,35 rev/µg. Para as demais linhagens e condições testadas não foram observados efeitos mutagênicos (Tabela 10).

De forma análoga, não foi observado aumento significativo no número de revertentes por placa comparando o controle negativo com as amostras do corante Reactive Blue 15. Logo, esse corante não foi capaz de induzir mutagenicidade em nenhuma linhagem de *Salmonella* sob as condições testadas (Tabela 11).

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) encontrado nos testes de viabilidade se apresentou dentro dos padrões estabelecidos, $1,0-2,0 \times 10^9$ UFC/mL.

Tabela 10. Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Blue 4 com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, YG1041 2 YG1042

Concentração (µg/placa)	Média do número de revertentes/placa ± desvio padrão							
	TA98		TA100		YG1041		YG1042	
	SEM S9	COM S9	SEM S9	COM S9	SEM S9	COM S9	SEM S9	COM S9
0.5	43,7 ± 5,5	50,7 ± 7,6	167,7 ± 9,6	166,0 ± 21,6	-	-	140,0 ± 12,0	147,7 ± 10,0
5	45,3 ± 2,1	52,7 ± 5,1	168,3 ± 6,5	169,3 ± 6,1	-	-	125,3 ± 2,5	136,7 ± 13,6
10	-	-	-	170,0 ± 7,8	-	-	-	-
25	-	-	-	185,3 ± 4,2*	-	-	-	-
50	32,5 ± 0,7	47,0 ± 3,6	182,3 ± 13,6	199,3 ± 18,6*	49,0 ± 2,6	-	130,3 ± 3,8	151,7 ± 11,6
100	-	-	-	221,0 ± 8,5**	47,7 ± 2,1	-	-	-
250	-	-	-	240,3 ± 15,5**	44,7 ± 7,4	55,7 ± 5,1	-	-
400	-	-	-	276,3 ± 21,0**	-	-	-	-
500	41,7 ± 0,6	49,7 ± 6,0	179,7 ± 8,5	-	49,0 ± 1,0	46,0 ± 2,6	165,0 ± 16,6	169,0 ± 12,5
1000	-	-	-	-	46,3 ± 1,5	50,7 ± 4,5	-	-
2500	-	-	-	-	50,0 ± 4,4	52,7 ± 1,5	-	-
5000	28,3 ± 3,2	40,0 ± 4,6	160,3 ± 9,8	-	52,7 ± 10,1	56,3 ± 4,1	167,3 ± 6,0	154,0 ± 7,2
Controle Negativo	42,2 ± 3,4	39,4 ± 7,9	160,6 ± 10,7	156,2 ± 10,7	42,8 ± 4,3	50,8 ± 6,1	134,2 ± 16,0	128,5 ± 7,3
Controle Positivo	495,0 ± 7,1 ^a	1252,5 ± 3,5 ^b	1965,0 ± 7,1 ^a	1880,0 ± 28,3 ^b	530,0 ± 42,4 ^c	2375,0 ± 21,2 ^d	1024,5 ± 37,5 ^e	499,5 ± 16,3 ^b
Potência mutagênica (rev/µg)	X	X	X	0,35	X	X	X	X

-: concentração não testada

^a: óxido de 4 nitroquinolina (0,05 µg/µL)

^b: 2 aminoantraceno (0,25 µg/ µL)

^c: 4 nitro-orto-fenilenodiamina (1,00 µg/ µL)

^d: 2 aminoantraceno (0.00625 µg/ µL)

^e: 2 nitrofluoreno (1,00 µg/ µL)

X: não mutagênico

*: significância em 5%

**: significância em 1%

Tabela 11. Avaliação da mutagenicidade do corante Reactive Blue 15 com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, YG1041 e YG1042

Concentração (µg/placa)	Média do número de revertentes/placa ± desvio padrão							
	TA98		TA100		YG1041		YG1042	
	SEM S9	COM S9	SEM S9	COM S9	SEM S9	COM S9	SEM S9	COM S9
0.5	27,0 ± 2,0	39,0 ± 6,9	191,0 ± 12,7	219,3 ± 10,7	137,0 ± 2,6	209,3 ± 5,5	105,7 ± 9,8	145,0 ± 9,9
5	27,5 ± 0,7	37,5 ± 4,9	188,0 ± 4,2	207,0 ± 9,0	146,3 ± 14,2	187,6 ± 16,0	122,0 ± 15,0	141,0 ± 12,8
50	22,0 ± 1,4	44,5 ± 6,4	184,5 ± 6,4	225,5 ± 6,4	131,7 ± 15,9	198,0 ± 15,0	131,3 ± 11,7	148,0 ± 13,7
500	21,0 ± 5,0	37,3 ± 6,6	184,0 ± 5,3	218,0 ± 15,6	123,0 ± 8,5	166,0 ± 13,2	134,7 ± 11,0	137,7 ± 11,2
5000	18,7 ± 4,7	28,7 ± 5,0	170,7 ± 14,0	202,7 ± 7,5	131,0 ± 3,6	140,0 ± 16,1	128,7 ± 9,0	137,7 ± 11,2
Controle Negativo	26,5 ± 3,7	30,75 ± 5,6	194,0 ± 4,7	219,0 ± 8,5	197,8 ± 15,8	221,8 ± 7,9	134,2 ± 16,0	128,5 ± 7,3
Controle Positivo	310,0 ± 14,1 ^a	1430,0 ± 99,0 ^b	2110,0 ± 42,4 ^a	2415,0 ± 91,9 ^b	1947,5 ± 89,8 ^c	542,0 ± 11,3 ^d	1024,5 ± 37,5 ^e	499,5 ± 16,3 ^b
Potência mutagênica (rev/µg)	X	X	X	X	X	X	X	X

^a: óxido de 4 nitroquinolina (0,05 µg/µL)

^b: 2 aminoantraceno (0,25 µg/ µL)

^c: 4 nitro-orto-fenilenodiamina (1,00 µg/ µL)

^d: 2 aminoantraceno (0.00625 µg/ µL)

^e: 2 nitrofluoreno (1,00 µg/ µL)

X: não mutagênico

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O corante Reactive Blue 4 foi cerca de 20 vezes mais tóxico para *Daphnia similis* comparado ao corante Reactive Blue 15. Essa toxicidade pode estar associada à estrutura química do corante. O primeiro apresenta diclorotriazina como grupo reativo e o segundo monoclortriazina. Possivelmente a inserção de um átomo de cloro na estrutura do corante Reactive Blue 4 seja responsável pelo efeito observado. Ferraz et al. (2011) avaliaram dois corantes têxteis e também verificaram esse efeito do cloro ao estudar a toxicidade dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 para *Daphnia similis*. As impurezas das amostras de corantes também podem ter contribuído para a toxicidade observada.

De acordo com Bae e Freeman (2007), os corantes diretos complexados com cobre estudados, na sua maioria, apresentaram elevada toxicidade para *Daphnia magna* (CE_{50} 48 h=1,00-10,00 mg/L). Possivelmente esse efeito não se deve apenas ao átomo de cobre, pois o corante RB 15 apresenta esse elemento complexado à sua estrutura e não apresentou elevada toxicidade. Sugere-se que o grupo cromóforo e a classe sejam fatores importantes na toxicidade dos corantes.

Villegas-Navarro et al. (2001) realizaram estudos com efluentes têxteis e observaram que os corantes contribuíram para a toxicidade em *Daphnia magna* em todas as amostras coletadas em diferentes etapas do tratamento do efluente.

Os corantes RB 4 e RB 15 podem ser classificados como moderadamente tóxico (CE_{50} de 10,00-100,00 mg/L) e relativamente não tóxico ($CE_{50} > 100,00$ mg/L), respectivamente (BAE; FREEMAN, 2007). Segundo a *Global Harmonization System* (GHS), sistema que visa padronizar a classificação de produtos químicos, o corante RB 4 também pode ser classificado como nocivo para a vida aquática (CE_{50} de 10,00-100,00 mg/L). Ressalto que informações como exposição e concentração no meio ambiente devem ser consideradas para determinar de forma mais efetiva o risco dessas substâncias para os organismos e ambiente.

Nos ensaios com *Vibrio fischeri*, parâmetros como pH e coloração das amostras devem ser avaliados com atenção, uma vez que esse organismo é sensível ao pH, bem como a coloração pode causar uma redução não específica na luminescência que não se diferencia da redução causada por uma substância nociva, alterando os valores de toxicidade das amostras.

Para amostras com coloração intensa é adequado expressar os resultados em valores de CE_{20} , pois a concentração que causa imobilidade em 50% dos organismos (CE_{50}) é mais colorida e pode interferir na leitura da bioluminescência, tornando o ensaio menos realístico (WANG et al., 2002). Por isso, neste ensaio nós determinamos tanto os valores de CE_{20} quanto CE_{50} . Em ambos os casos, RB 4 foi mais tóxico que o RB 15.

A maioria dos corantes têxteis estudados quanto a sua toxicidade para *Vibrio fischeri* pertence ao tipo azo. Gotllieb et al. (2003) avaliaram seis azo corantes e os mesmos apresentaram CE_{50} entre 15,70 e 71,00 mg/L. Comparado aos valores obtidos para os corantes RB 4 e RB 15, verificamos que os azo corantes avaliados foram mais tóxicos para *Vibrio fischeri*, sugerindo que a estrutura química pode interferir na toxicidade. Wang et al. (2002) também avaliaram onze azo corantes reativos e observaram uma faixa de CE_{20} de 5-600,00 mg/L. Embora os corantes reativos avaliados no presente estudo não pertençam a classe dos azo corantes, o RB 4 e RB 15 apresentaram valores de CE_{20} dentro da faixa obtida por Wang et al. (2002).

Epolito et al. (2005) investigaram a toxicidade do corante comercial RB 4 para *V. fischeri* e encontraram CE_{50} igual 1.108 mg/L, cerca de 2 vezes menos tóxico comparado com o resultado obtido neste trabalho (584,82 mg/L). No entanto, é importante salientar que os corantes são de diferentes empresas (Sigma e DyStar) e corantes comerciais podem conter outras substâncias químicas em sua formulação, como foi observado por Vacchi et al. (2013). Os autores encontraram diferentes substâncias no corante comercial Disperse Red 1, como outros corantes e agentes dispersantes.

Osugi et al. (2006) avaliaram a toxicidade aguda do corante RB 15 para a bactéria luminescente. A CE_{20} 15' foi igual a 62,00 mg/mL. Esse valor diferiu do encontrado nesse trabalho. Essa diferença pode estar associada com impurezas e variações que podem ocorrer nas amostras de corantes ou ainda por diferenças de técnicas empregadas.

Apesar da baixa toxicidade encontrada nos bioensaios de toxicidade aguda, o corante RB 15 merece atenção, pois Osugi et al. (2006) observaram que após o tratamento por fotoeletrocatalise, a toxicidade aumentou, resultado da liberação dos íons cobre presente na sua estrutura química durante o processo de tratamento.

Analizando os valores de CE_{50} encontrados nos testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* observou-se que os ensaios com microcrustáceo foi mais sensível que o ensaio com a bactéria. Para o corante RB 15, *Daphnia similis* foi cerca de 84 vezes mais sensível que *Vibrio fischeri* e para RB 4 cerca de 53 vezes.

Da mesma forma, Barata et al. (2008) avaliaram misturas contendo compostos de origem industrial empregando diferentes bioensaios e observaram que testes com *Daphnia magna* foram mais sensíveis que outros, como o ensaio com *Vibrio fischeri*.

Liu et al. (2002) também compararam a toxicidade de diferentes tipos de efluentes para os organismos *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*. Ao final do trabalho verificaram que *Daphnia* se mostrou mais sensível nos ensaios. No entanto, houve efluentes tóxicos apenas para uma espécie, evidenciando a importância de se utilizar mais de um organismo teste na avaliação da toxicidade.

A maior sensibilidade de *Daphnia* comparada com *Vibrio fischeri* aos corantes pode estar relacionada com a presença de compostos nitrogenados, visto que, de acordo com Martins et al. (2007), *Daphnia magna* possui elevada sensibilidade a estes compostos. Ressalto que *D. similis*, utilizada neste trabalho, apresenta sensibilidade semelhante a *D. magna* (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004).

Outra hipótese para a diferença de sensibilidade está relacionada com a ingestão de contaminantes, visto que organismos como microcrustáceos e peixes durante os bioensaios podem ingerir mais substâncias, comparado a bactérias (BARATA et al., 2008).

No entanto, a comparação direta da sensibilidade de *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* deve ser realizada com muita cautela, uma vez que os *endpoints* analisados são distintos e há diferença na complexidade dos organismos teste.

Dados de toxicidade crônica de corantes empregando dafinídeos são escassos. No entanto, são de grande relevância, pois os organismos no ambiente aquático estão expostos a níveis subletais dos contaminantes, devido principalmente a fatores de diluição dos corpos d'água (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

O corante Reactive Blue 4 apresentou efeitos aparentemente discrepantes em relação à fecundidade, nas menores concentrações induziu a reprodução, na maior concentração (20,00 mg/L) foi capaz de reduzir o tamanho da prole e na

concentração de 40,00 mg/L (dado não apresentado), o corante causou mortalidade em cerca de 60% dos organismos expostos.

Como citado acima, o corante RB 4 foi capaz de aumentar a fecundidade de *C. dubia* na maioria das concentrações avaliadas. Esse aumento observado pode ser classificado como *hormesis*. Segundo Chapman (2001), *hormesis* pode ser definida como um efeito estimulante que ocorre quando as substâncias em altas concentrações causam efeitos negativos e produz um efeito positivo nas menores concentrações, como aumento na reprodução ou crescimento. Comumente esse evento causa um acréscimo de 30-60% de efeito comparado ao controle. A hipótese é que *hormesis* seja uma compensação para uma alteração na homeostasia dos organismos (STEBBING, 1998). No presente trabalho, observou-se que o corante Reactive Blue 4 aumentou até cerca de 68% do número médio de neonatas (segunda repetição).

O efeito *hormesis* também foi observado por Rodriguez; Martinez-Madrid e Cid (2006) expondo *Daphnia magna* a diferentes efluentes industriais. Nas condições avaliadas pelos autores houve aumento da reprodução nas menores concentrações de efluentes comparado ao controle negativo. Zalizniak e Nugegoda (2006) observaram efeito *hormesis* em *Daphnia carinata* expostas a concentrações subletais do inseticida clorpirifós, aumentando o tamanho da prole nas concentrações mais baixas. Pagnanelli et al. (2008) identificaram o efeito *hormesis* em *Lepidium sativum* expostos a efluentes de atividades mineradoras após tratamento biológico, identificando um índice de germinação superior nas amostras comparado ao controle negativo. De Nicola et al. (2004) observaram o mesmo efeito em organismos expostos a taninos utilizados em curtumes, aumentando as taxas de fertilização em ouriços do mar e crescimento em algas.

Segundo Rodriguez; Martinez-Madrid e Cid (2006) o efeito *hormesis* deve ser avaliado com profundidade para entender os processos que culminam a este evento. Segundo o autor, a sobrevivência das neonatas e alterações na geração seguinte devem ser avaliadas. Hammers-Wirtz e Ratte (2000) observaram um aumento no número de filhotes de dafinídeos expostos a um dispersante, utilizado na produção de corantes e tingimento têxtil. No entanto, esse aumento na prole estava associado a uma queda na qualidade da mesma, pois a geração proveniente dessa apresentou maior mortalidade e decréscimo no tamanho, peso e reprodução. Nesse estudo, foi possível concluir que a segunda geração apresentou danos mesmo em baixas

concentrações, ao passo que a primeira geração aparentemente não foi prejudicada. Bervoets et al. (1996) avaliaram os efeitos de efluentes industriais sob a primeira e segunda geração de *Daphnia magna* e observaram que os valores de CENO na segunda geração eram cerca de dez vezes menores quando comparados com a primeira geração. Dessa forma, é possível predizer que o efeito *hormesis* pode prejudicar as populações através do aumento da sensibilidade, redução do tamanho e peso dos organismos, possivelmente maior predação e menor sucesso na competição, podendo reduzir a viabilidade populacional.

De acordo com Chapman (2001) não é raro dafínídeos expostos a agentes estressores aumentarem o tamanho da prole, mas a reprodução pode ser atrasada e o tamanho dos ovos reduzido. Segundo Hammerz-Wirtz e Ratte (2000) a mudança na distribuição de biomassa em um número e tamanho diferente dos ovos produzidos por dafínídeos é uma adaptação ecológica importante frente às mudanças das condições ambientais, como tentativa de manter a população mesmo em condições adversas. Frente ao exposto, sugerimos que a exposição ao corante RB 4, ainda que em baixas concentrações, pode conduzir a efeitos deletérios em populações de microcrustáceos à longo prazo.

Os poluentes podem causar uma mudança no balanço de espécies coexistentes e à longo prazo podem alterar a biodiversidade. Esse processo é resultado do aumento ou redução das populações (GUARATINI et al., 2008).

Os dafínídeos apresentam um papel central na cadeia alimentar. Eles são alimentos de peixes devido ao tamanho, mobilidade e alto valor nutricional, além de, serem muito importantes na passagem de energia dos produtores primários para outros consumidores. A extinção ou mesmo a redução nas populações de dafínídeos podem afetar a complexa teia alimentar do ecossistema aquático (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001; ABRANTES; GONÇALVES, 2003; LEE et al., 2011).

Steinberg; Sturzenbaum e Menzel (2008) afirmam que o efeito *hormesis* não está limitado apenas a uma resposta adaptativa simples, mas relacionado com a ativação de diferentes vias celulares. Gong et al. (2007) identificaram um aumento na reprodução de *Eisenia fetida* expostas a baixas concentrações de trinitrotolueno (TNT) e verificaram que nessas condições a expressão de vários genes foi modificada.

De acordo com Calabrese e Blain (2011) há na literatura mais de 2.500 artigos publicados sobre o efeito *hormesis*, com cerca de 9.000 *endpoints* avaliados.

Aproximadamente 2.000 diferentes agentes de 245 classes químicas foram testados empregando principalmente modelos animais. Esse elevado número de resultados pode refletir a plasticidade biológica, ou seja, a capacidade dos organismos de responderem a mudanças no ambiente através de ajustes bioquímicos e fisiológicos para sobreviverem às condições adversas.

Os ensaios de crescimento populacional, considerando as gerações subsequentes e avaliações toxicogenômicas, podem ser uma alternativa para explicar os efeitos causados pelo corante RB 4.

Em contrapartida, o corante Reactive Blue 15 foi capaz de reduzir a fecundidade de *C. dubia*. Esse corante foi classificado como relativamente não tóxico para *D. similis* no ensaio de toxicidade aguda. No entanto, observamos que ele causa efeitos na reprodução mesmo em baixas concentrações. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Ferrão-Filho et al. (2009). Os pesquisadores observaram efeitos crônicos em *Daphnia gessneri* e *Moina micrura* expostas a cianotoxinas presentes na água de um reservatório eutrófico e baixa mortalidade nos ensaios de toxicidade aguda. Esses resultados expressam a importância dos ensaios crônicos na avaliação da toxicidade de substâncias.

Os resultados obtidos no presente trabalho são preocupantes do ponto de vista ambiental, pois as concentrações testadas podem ser facilmente atingidas considerando a estimativa de lançamento de 1,2 toneladas de corantes por dia no ambiente aquático, sendo que essa grande quantidade lançada é devida principalmente à baixa fixação dos corantes às fibras tingidas (GUARATINI; ZANONI, 2000). Considerando os corantes reativos, como citado anteriormente, até 50% da concentração inicial pode não se fixar à fibra têxtil (AKSU; ISOGLU, 2006). Adicionalmente, é importante considerar que devido às exigências do mercado consumidor em relação à robustez da cor nas fibras coloridas frente a diferentes processos, como transpiração, lavagem e exposição ao sol, as moléculas de corantes utilizadas são cada vez mais estáveis, aumentando o tempo de meia vida destes compostos no ambiente. Por exemplo, o tempo de meia vida da forma hidrolisada do corante Reactive Blue 19 é de 46 anos sob pH 7,00 e 25 °C (HAO; KIM; CHIANG, 2000).

Podemos observar que houve uma diferença de sensibilidade nos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* e os testes de toxicidade crônica com *C. dubia*, especialmente para o corante RB 4, que apresentou valores de inibição na

reprodução acima da concentração que causou mortalidade em 50% dos organismos expostos (CE_{50}). Segundo Cowgill (1987) essa diferença pode ser atribuída a características fisiológicas do animal (estado nutricional ou estágio no ciclo de vida), condições da cultura (alimentação, temperatura ou fotoperíodo) e propriedades da substância avaliada (solubilidade, degradação ou pureza). Coelho e Rocha (2010) observaram diferença na sensibilidade de 3 microcrustáceos expostos a surfactante comparado com dados da literatura e atribuíram essa diferença principalmente à dureza da água, que é capaz de alterar a toxicidade. Lopes et al. (2009) compararam os efeitos tóxicos da ivermectina em duas linhagens de *Daphnia magna* (européia e japonesa) e *Ceriodaphnia dubia* e observaram que há diferenças entre a mesma espécie, *D. magna*, visto que a linhagem japonesa foi mais resistente à ivermectina quando comparado com a linhagem européia. Adicionalmente, identificaram maior sensibilidade de *D. magna* comparado com *C. dubia* e afirmaram que organismos menores tendem a ser mais sensíveis, porém essa regra nem sempre é válida.

Em relação à quantificação de cobre em *C. dubia*, não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de cobre mensurada nos organismos do controle negativo e organismos expostos ao corante Reactive Blue 15. Esse fato provavelmente se deve à regulação do metal no organismo, que poderia aumentar a excreção para manter a concentração do metal essencial em uma faixa adequada.

Segundo Santos; Melão e Lombardi (2008), a regulação da concentração de cobre no zooplâncton não é um processo incomum e pode ser utilizado como uma estratégia para a regulação do metal. Esses autores avaliaram a quantidade de cobre em *Ceriodaphnia silvestrii* expostas a concentrações crescentes do metal na presença e ausência de substâncias húmicas e observaram que essa espécie apresentou valores de concentração de cobre semelhantes nos tratamentos.

De acordo com o trabalho de Bossuyt e Janssen (2005) há evidências de que *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Daphnia magna* possam regular a concentração de cobre no seu organismo para manter a homeostasia do metal dentro da faixa ótima.

Testes com o anfípoda de água doce, *Hyalella azteca*, também mostraram que a concentração de cobre foi totalmente regulada por esse organismo e consequentemente o metal não se acumulou nos indivíduos (BORGSMANN; NORWOOD; CLARKE, 1993).

Os metais essenciais como cobre e zinco tendem a ser ativamente regulados por algas, crustáceos, decápodes e peixes, ou seja, esses organismos mantêm as concentrações estáveis excretando o metal em taxas comparáveis com a ingestão (AMIARD et al., 1987). Quando os organismos são expostos a altas concentrações de metais, proteínas podem ser induzidas, como metalotioneínas e fitoquelatinas, para se ligarem e detoxificarem o metal no organismo, sendo essas proteínas importantes na regulação da homeostasia, armazenamento, transporte e metabolismo de metais traço essenciais, como cobre e zinco. Dessa forma, os organismos podem desencadear algum grau de tolerância aos metais (GRILL; WINNACKER; ZENK, 1985; ROESIJADI, 1992; RAINBOW, 2002; CHAPMAN; WANG, 2000; BOSSUYT; JANSSEN, 2005).

Os corantes RB4 e RB15 não foram capazes de induzir lesões genômicas em fibroblastos de derme humana sob as condições testadas.

Wollin e Gorlitz (2004) estudaram 9 azo corantes e todos foram capazes de induzir lesões no DNA, identificadas a partir do ensaio do Cometa. Tsuboy (2007) observou que o azo corante Disperse Blue 291 também foi capaz de induzir a fragmentação do DNA. Oliveira et al. (2010) avaliaram a genotoxicidade de 3 azo corantes, Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13, e todos foram capazes de induzir lesões genômicas. O azo corante Reactive Blue 59 também foi capaz de causar danos ao DNA em colemócitos da minhoca *Dichogaster curgensis* expostas ao corante (KOLEKAR; KODAM, 2012). Sasaki et al. (2002) avaliaram 5 azo corantes, utilizados como aditivos alimentares, em 8 órgãos de ratos e observaram que 4 foram genotóxicos para cólon, estômago, fígado, rim, bexiga urinária e pulmão. Tsuda et al. (2000) estudaram 24 azo corantes em diferentes órgãos de rato e verificaram que 17 foram genotóxicos para pelo menos um órgão, 14 induziram danos no cólon e 12 causaram danos no fígado. O azo corante Sudan I também foi capaz de causar quebras na estrutura do DNA em células HepG2 (AN et al., 2007). Desta forma, a estrutura do corante pode estar relacionada com a genotoxicidade encontrada nos trabalhos citados, sendo que, a toxicidade dos azo corantes está associada principalmente com o potencial de formação de produtos aromáticos tóxicos, com propriedades mutagênicas e carcinogênicas (ZBAIDA, 1995).

Rajaguru et al. (2001) verificaram que o corante Reactive Blue 15 foi moderadamente genotóxico nos ensaios *in vivo* com eritrócitos de girinos de *Rana*

hexadactyla. Segundo os autores, geralmente os corantes precisam de ativação metabólica para causar danos no DNA. Desta forma, é possível que os produtos de metabolização do corante RB 15 exerçam atividade genotóxica. No entanto, é possível também que este dano no DNA seja reparado, pois este corante não induziu mutagenicidade mesmo na presença de S9 nos ensaios com *Salmonella*, como apresentado anteriormente no item resultados. Para comprovarmos esta hipótese, poderíamos realizar o ensaio *in vitro* adicionando-se ativação metabólica exógena, como a fração S9 (TICE et al., 2000).

O uso de linhagens celulares derivadas de derme humana é uma ferramenta importante na avaliação da toxicidade, pois as mesmas podem representar a exposição dérmica aos contaminantes (WOLLIN; GORLITZ, 2004).

O corante Reactive Blue 4 foi capaz de induzir mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* através do mecanismo de substituição de pares de base, visto que esse é o mecanismo detectado pela linhagem TA100. Apesar da baixa potência mutagênica do corante RB 4, é importante ressaltar que não há um limiar de tolerância para compostos mutagênicos (CHASIN; AZEVEDO, 2003).

O sistema de metabolização exógeno teve um papel importante na mutagenicidade observada. Possivelmente, os produtos gerados após a ação das isoformas do citocromo P450 foram mais reativos com o DNA. Segundo Rajaguru et al. (2001) alguns corantes necessitam de ativação metabólica para indução de genotoxicidade. Umbuzeiro et al. (2005) também verificaram que a adição de S9 é capaz de aumentar a resposta mutagênica do produto comercial CI Disperse Blue 291.

De acordo com Hagiwara et al. (1993) existem compostos mutagênicos que não são ativados por nitroredutases e acetiltransferases, com isso, a mutagenicidade do composto nas linhagens parentais TA98 e TA100 são semelhantes ou maiores que nas linhagens modificadas YG1041 e YG1042, como foi observado para o corante Reactive Blue 4.

Malachová et al. (2006) avaliaram diferentes corantes têxteis, dentre eles o Reactive Orange 16. Esse corante exibiu comportamento semelhante ao corante Reactive Blue 4, ambos apresentaram baixa potência mutagênica para a linhagem TA100 e a elevada produção de nitroredutases e acetiltransferases nas linhagens YG não contribuíram ou aumentaram a mutagenicidade.

O corante Reactive Blue 15 não induziu mutagenicidade em nenhuma linhagem de *Salmonella typhimurium* sob as condições testadas. Essa resposta também foi observada por Osugi et al. (2006).

O tratamento correto dos efluentes têxteis é de grande importância e atualmente não há no estado de São Paulo uma legislação ambiental que disponha unicamente sobre corantes. No entanto, em 19 de junho de 2013 foi aprovado pela Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo (ALESP) o Projeto de Lei nº 333/2012 elaborado pelo deputado estadual Reinaldo Alguz (PV). De acordo com o deputado, o projeto de lei “proíbe o lançamento de efluentes que contenham corante em rios, lagos, represas e demais corpos de água doce do Estado de São Paulo, e determina a classificação dos corantes como contaminantes ambientais”. Atualmente, o projeto está tramitando no governo estadual. Se esse projeto for sancionado, certamente contribuirá para a preservação do ambiente e redução dos riscos associados a estes compostos, pois é cientificamente conhecido o efeito nocivo ao homem e muitos outros organismos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O corante Reactive Blue 4 foi mais tóxico para *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* quando comparado ao corante Reactive Blue 15;
- Reactive Blue 4 foi classificado como moderadamente tóxico e RB 15 como relativamente não tóxico para *Daphnia similis*;
- Ambos corantes foram capazes de reduzir a bioluminescência de *Vibrio fischeri* em elevas concentrações;
- O ensaio com *Daphnia similis* se mostrou mais sensível que o teste com *Vibrio fischeri* para os corantes e *endpoints* avaliados;
- Reactive Blue 4 induziu efeito *hormesis*, ou seja, houve um estímulo na reprodução de *C. dubia* nas menores concentrações, seguido por um decréscimo em concentrações mais elevadas;
- Reactive Blue 15 reduziu a fecundidade de *Ceriodaphnia dubia*;
- Não houve acúmulo de cobre em *Ceriodaphnia dubia* expostas a concentrações crescentes do metal presente na estrutura do corante Reactive Blue 15, provavelmente devido à autoregulação da concentração de cobre em seu organismo;
- Ambos corantes não foram genotóxicos para fibroblastos de derme humana nas condições testadas;
- O corante Reactive Blue 4 foi capaz de induzir substituição de pares de base em *Salmonella typhimurium* e a metabolização exógena (S9) possivelmente gerou produtos mais reativos com DNA para a linhagem de *Salmonella* TA 100;
- A elevada produção de nitroredutases e acetiltransferases presentes nas linhagens de *Salmonella* YG1041 e YG1042 não alterou a toxicidade dos corantes Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15 e
- Os corantes podem causar efeitos adversos nos organismos e o lançamento contínuo dessas substâncias nos corpos d'água é preocupante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, N.; GONÇALVES, F. The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. **Acta Oecologica**, v. 24, p. 245-249, 2003.
- AKSU, Z.; ISOGLU, I. A. Use of agricultural waste sugar beet pulp for the removal of Gemazol turquoise blue-G reactive dye from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 418-430, 2006.
- AMIARD, J. C. et al. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 106, p. 73-89, 1987.
- AN, Y. et al. Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 627, p. 164-170, 2007.
- ANASTASI, A. et al. Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes. **New Biotechnology**, v. 29, p. 38-45, 2011.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**, São Carlos: Rima Editora, 2006, p. 117-152.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABQUIM). Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/sobre-o-produto>>. Acesso em: 29 de maio de 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). Disponível em: < <http://www.abit.org.br/Abit.aspx#4>>. Acesso em: 27 de maio de 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática- Toxicidade aguda- Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009. 23 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática- Toxicidade crônica- Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2010. 18 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3**: Ecotoxicologia aquática-Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2012. 23 p.

AZUR ENVIRONMENTAL, 1998. Microtox Acute Toxicity Test. Disponível em: <http://www.coastalbio.com/images/Acute_Overview.pdf>. Acesso em 08 de maio de 2013.

BAE, J. S.; FREEMAN H. S. Aquatic toxicity evaluation of copper-complexed direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, v.73, p. 126-132, 2007.

BARATA, C. et al. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents. **Science of the Total Environment**, v. 405, p. 78-86, 2008.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 2507-2536, 2011.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p.267-281, 1982.

BERVOETS, L. et al. Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. **Environmental Pollution**, v. 91, p. 333-341, 1996.

BEYDILLI, I. M.; PAVLOSTATHIS, S. G.; TINCHER, W. C. Biological decolorization of the azo dye Reactive Red 2 under various oxidation–reduction conditions. **Water Environment Research**, v. 72, p. 698–705, 2000.

BIZANI, E. et al. Photocatalytic decolorization and degradation of dye solutions and wastewaters in the presence of titanium dioxide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 85-94, 2006.

BONNET, J. L. et al. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 576-583, 2008.

BORGMANN, U.; NORWOOD, W. P.; CLARKE, C. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. **Hydrobiologia**, v. 259, p. 79-89, 1993.

BOSSUYT, B. T. A.; JANSSEN, C. R. Copper regulation and homeostasis of *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: influence of acclimation. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 135-144, 2005.

BRIX, R. et al. Identification of disinfection by-products of selected triazines in drinking water by LC-Q-ToF-MS/MS and evaluation of their toxicity. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, p. 330-337, 2009.

BULICH, A. A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In MARKINGS, L. L.; KIMERLE, R. A. **Aquatic Toxicology**. STP 667 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1979, p. 98-106.

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

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Rima, 2006, p. 55-88.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 73-81, 2011.

CARNEIRO, P. A. et al. Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 694-699, 2010.

CARNEIRO, P. A. et al., Evaluation of different electrochemical methods on the oxidation and degradation of Reactive Blue 4 in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 59, p. 431-439, 2005.

CERÓN-RIVERA, M.; DÁVILA-JIMÉNEZ, M. M.; ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P. Degradation of the textile dyes Basic yellow 28 and Reactive black 5 using diamond and metal alloys electrodes. *Chemosphere*, v. 55, p. 1-10, 2004.

CHAMPAGNE, P. P.; RAMSAY, J. A. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2230-2235, 2010.

CHAPMAN, P. M. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, p. 499-505, 2001.

CHAPMAN, P. M; WANG, F. Issues in ecological risk assessment of Inorganic Metals and Metalloids. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 6, p. 965-988, 2000.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Carlos: Rima e São Paulo: Intertox, 2003, p. 127-165.

CHEN, X. D. et al. Mixture effects of the nonyl phenylpolyethoxylate, R-11 and the insecticide, imidacloprid on population growth rate and other parameters of the crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 73, p. 132-137, 2010.

COELHO, K. S.; ROCHA, O. Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 812-818, 2010.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **L5.227**: Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio. São Paulo, 2001. 13 p.

CONSTANTINE, L. A.; HUGGETT, D. B. A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Chemosphere**, v. 80, p. 1069-1074, 2010.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

COWGILL, U. M. Critical analysis of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproducibility of toxicity test results. **Water Research**, v. 21, p. 1453-1462, 1987.

DE NICOLA, E. et al. Hormetic versus toxic effects of vegetable tannin in a multitest study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 336-344, 2004.

DOMIGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Rima, 2006, p. 153-184.

EPOLITO, W. J. et al. Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive Blue 4. **Dyes and Pigments**, v. 67, p. 35-46, 2005.

EPOLITO, W. J. et al. Kinetics of zero-valent iron reductive transformation of the anthraquinone dye Reactive Blue 4. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, p. 594-600, 2008.

FERRÃO-FILHO, A. S. et al. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 479-489, 2009.

FERRAZ, E. R. A. et al. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 489-497, 2011.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GARAJ-VRHOVAC, V.; OREŠČANIN, V. Assessment of DNA sensitivity in peripheral blood leukocytes after occupational exposure to microwave radiation: the alkaline comet assay and chromatid breakage assay. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 33-43, 2009.

GIROTTI, S. et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, p. 2-29, 2008.

GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS (GHS). **Part 4: Environmental Hazards**. Disponível em: <http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/English/04e_part4.pdf>. Acesso em: 30 de maio de 2013.

GONEM, F.; AKSU, Z. Single and binary dye and heavy metal bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*: use of response surface methodology (RSM) for the estimation of removal yields. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 1512-1519, 2009.

GONG, P. et al. Toxicogenomic analysis provides new insights into molecular mechanisms of the sublethal toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in *Eisenia fetida*. **Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 8195-8202, 2007.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do Cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p. 247-279.

GOTTLIEB, A. et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 49-56, 2003.

GOZMEN, B. et al., Oxidative degradations of reactive blue 4 dye by different advanced oxidation methods. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p. 129-136, 2009.

GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. **Science**, v. 230, p. 674-676, 1985.

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

GUARATINI, T. et al. Ecotoxicologia. In OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008, p. 125-141.

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

HAGIWARA, W. et al. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, v. 291, 171-180, 1993.

HAI, F. I.; YAMAMOTO, K.; FUKUSHI, K. Development of a submerged membrane fungi reactor for textile wastewater. **Desalination**, v. 192, p. 315–322, 2006.

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

HAMMERS-WIRTZ, M.; RATTE, H. N. Offspring fitness in daphnia: is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, p. 1856-1866, 2000.

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

HELLMAN, B.; VAGHEF, H.; BOSTROM, B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, p. 123-131, 1995.

IQBAL, MANSOOR. Dyes & Colour. In_ **Textile Dyes**. Karachi: Rahbar Publishers, 2008. p. 01-06.

JADHAV, J. P. et al. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 165-173, 2010.

JARVIS, A.S. et al. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.33, p.193-200, 1996.

KARIYAJJANAVAR, P.; JOGTTAPPA, N.; NAYAKA, Y. A. Studies on degradation of reactive textile dyes solution by electrochemical method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 952-961, 2011.

KEATING, K.I. A system of defined (*Sensu stricto*) media for daphnid (Cladocera) culture. **Water Research**, v. 19, p. 73-78, 1985.

KHAN, F. R.; BURY, N. R.; HOGSTRAND, C. Copper and zinc detoxification in *Gammarus pulex* (L.) **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 822-832, 2012.

KOLEKAR, Y. M. et al. Decolorization and biodegradation of azo dye, Reactive Blue 59 by aerobic granules. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 818-822, 2012.

KOLEKAR, Y. M.; KODAM, K. M. Decolorization of textile dyes by *Alishewanella* sp. KMK6. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 521-529, 2012.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

LAWS, E. A. Metals. In: _ **Aquatic pollution: an introductory text**. 3. ed. New York: Wiley, 2000. p. 351-415.

LEE, J. et al. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1216-1225, 2011.

LIMA, R. O. A. et al. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, p. 53-60, 2007.

LIU, M. C. et al. Toxicity of different industrial effluents in Taiwan: a comparison of the sensitivity of *Daphnia similis* and Microtox. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 93-97, 2002.

LOPES, C. et al. Toxicity of ivermectin on cladocerans: comparison of toxic effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 2160-2166, 2009.

MA, M. et al. Acute toxicity bioassay using the freshwater luminescent bacterium *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov.-Q67. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 247-253, 1999.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; SIVIERO, F. Mutagênese e carcinogênese. In OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008, p. 81-99.

MALACHOVÁ, K. et al. Reduction in the mutagenicity of synthetic dyes by successive treatment with activated sludge and the ligninolytic fungus, *Irpex lacteus*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p.533-540, 2006

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MARTINS, J.; TELES, L. O.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, p. 414-425, 2007.

MAZZO, T. M. et al. Analysis of aromatic amines in surface waters receiving wastewater from a textile industry by liquid chromatographic with electrochemical detection. **Analytical Letters**, v. 39, p. 2671-2685, 2006.

MENDONÇA, E. et al. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 665-670, 2009.

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

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Disperse Blue 1**. National Toxicology Program, 2011. Disponível em <<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/DisperseBlue1.pdf>>. Acesso em 30 de maio de 2013.

NORBERG-KING, T. J. **A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach**. Version 2.0 (software). US.EPA-Duluth, Minnesota, 1993.

NOVOTNÝ, C. et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, p. 1436-1442, 2006.

OCHOA-HERRERA, V. et al. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. **Science of the Total Environment**, v. 412-413, p. 380-385, 2011.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Directive 2002/61/EC of the European parliament and of the council of 19 July 2002 amending for the nineteenth time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azocolourants)**. Official Journal of the European communities, 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:243:0015:0018:en:PDF>>. Acesso em 28 de maio de 2013.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

OLIVEIRA, G. A. R. et al. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. **Mutation Research**, v. 703, p. 200-208, 2010.

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

OSUGI, M. E. et al. Photoelectrocatalytic oxidation of Remazol Turquoise Blue and toxicological assessment of its oxidation products. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 871-877, 2006.

PAGNANELLI, F. et al. Bioassessment of a combined chemical-biological treatment for synthetic acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, p. 567-573, 2008.

PARIKY, A.; SHAH, V.; MADAMWAR, D. Cyanobacterial flora from polluted industrial effluents. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 116, p. 91-102, 2006.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. Toxicity assessment of organic pollutants: Reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri*. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1806-1813, 2008.

PEKAKIS, P. A. et al. Treatment of textile dyehouse wastewater by TiO₂ photocatalysis. **Water Research**, v. 40, p. 1276-1286, 2006.

PRESTON, R. J.; HOFFMAN, G. R. Toxicologia Genética. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012, p. 123-135.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

RAJAGURU, P. et al. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 316-322, 2001.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. C.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003, p. 21-27.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M.; CID, A. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* Straus. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 559-572, 2006.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 22, p. 81-113, 1992.

SANTOS, M. A. P. F.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T. The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). **Ecotoxicology**, v. 17, p. 449-454, 2008.

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

SARMA, S. S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 41, p. 1417-1430, 2006.

SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, p. 103-119, 2002.

SCHNEIDER, K.; HAFNER, C.; JAGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, p. 83-91, 2004.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SINGH, N. P. et al. Simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton, zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos, Rima, 2001, 106 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL (SBMCTA). **Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microssoma)**. (Série de Documentos, 1). Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2004. Disponível em <http://www.sbmcta.org.br/_img/_documentos/8abf3bb568d1c7ba57cd3fff7a22880c.pdf>. Acesso em: 22 de maio de 2013.

SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E.; SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p. 1073-1078, 2007.

STEBBING, A. R. D. A theory for growth hormesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 403, p. 249-258, 1998.

STEINBERG, C. E. W.; STURZENBAUM, S. R.; MENZEL, R. Genes and environment: striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 142-161, 2008.

SURYAVATHI, V. et al. Acute toxicity of textile dye wastewaters (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice. **Reproductive Toxicology**, v. 19, p. 547-556, 2005.

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

TICE, R. et al. Single cell/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TILLI, S. et al., Differential decolorization of textile dyes in mixtures and the join effect of laccase and cellobiose dehydrogenase activities present in extracellular extracts from *Funalia trogii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 465-471, 2011.

TSUBOY, M. S. et al. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007.

TSUDA, S. et al. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 465, p. 11-26, 2000.

UMBUZEIRO, G. A. et al. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the *Salmonella* assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. C.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003, p. 81-112.

VACCHI, F. I. et al. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. **Science in the Total Environment**, v. 442, p. 302-309, 2013.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, p. 93-109, 2009.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.

VENKATARAMAN, K. The Chemistry of Synthetic Dyes. The Reactive Dyes; Academic Press; New York, Vol. III (1970), Vol. VII (1974). In: GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Textile dyes. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.

VERSTEEG, D. J. et al. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v. 34, p. 869-892, 1997

VILLEGAS-NAVARRO, A. et al. Determination of wastewater LC₅₀ of the different process stages of the textile industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 56-61, 2001.

WANG, C. et al. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs , auxiliaries and select effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. **Chemosphere**, v. 46, p. 339-344, 2002.

WANG, Y. et al. Experimental and theoretical studies on the photoinduced acute toxicity of a series of anthraquinone derivatives towards the water flea (*Daphnia magna*). **Dyes and Pigments**, v. 83, p. 276-280, 2009.

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

WEST, INC; GULLEY, D. **TOXSTAT 3.5**. University of Wyoming, 1996.

WOLLIN, K. M.; GÖRLITZ, B. D. Comparison of genotoxicity of textile dyestuffs in *Salmonella* mutagenicity assay, in vitro micronucleus assay, and single cell gel/comet assay. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, n. 23, p. 267–278, 2004.

ZAGATO, P. A. O uso de substâncias de referência no controle de qualidade de ensaios ecotoxicológicos. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Rima, 2006, p. 185-197.

ZALIZNIAK, L.; NUGEGODA, D. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 207-214, 2006.

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

ZHANG, T. et al. Rapid ecotoxicological testing using transformed BF-2 cells incorporating a luminescent reporter gene. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 797-803, 2005.