UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Corantes como importante classe de contaminantes ambientais - um
estudo de caso**

Danielle Palma de Oliveira

Tese para obtenção do
título de DOUTOR

Orientadora:
Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Corantes como importante classe de contaminantes ambientais - um
estudo de caso**

Danielle Palma de Oliveira

Tese para obtenção do
título de DOUTOR

Orientadora:
Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2005

Danielle Palma de Oliveira

**Corantes como importante classe de contaminantes ambientais - um
estudo de caso**

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
orientador/presidente**

Dr. Regis Nieto

Prof. Dr. Paolo di Mascio

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

Profa. Dra. Ana Paula Loureiro

São Paulo, 01 de março de 2005.

**"Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível"**
(São Francisco de Assis)

Dedico esse trabalho a minha família...

Por tudo que eles fizeram, desde o necessário até o impossível,
consegui chegar até aqui.

Aos meus pais, Claiton e Edna

Aos meus irmãos Gustavo e Guilherme

Todo meu amor e gratidão mesmo que em alguns momentos eu não
tenha demonstrado

"Aquele que obtém uma vitória sobre outros homens é forte,
mas aquele que obtém uma vitória sobre si próprio é poderoso".

(Lao-tzé)

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

(Cora Coralina)

À Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

Pela orientação, por todo conhecimento que adquiri neste tempo e pelas oportunidades que me ofereceu.

Mas principalmente agradeço pela amizade e pelo carinho em todos os momentos

"Há pessoas que nos falam e nem as escutamos; há pessoas que
nos ferem e nem cicatrizes deixam.

Mas há pessoas que, simplesmente, aparecem em nossa vida e
que marcam para sempre"

(Cecília Meireles)

À profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

Minha eterna professora de Toxicologia e amiga

"A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você". (Ralph Waldo Emerson)

Aos meus amigos

André Aggi, Bel, Camila, Carlos, Célia, Daiana, Daniel, Daniella, Diogo, Eliziane, Fabiana, Fabinho, Fábio, Fabriciano, Flávia, Francisco, Gabrielle, Guto, José Luis, Júlia, Juninho, Karen, Mateus (meu afilhado), Maurício, Patrícia, Paula, Paulo, Renata Amaral, Renata Rios, Renata Rosa, Rodrigo, Simone, Tânia, Tânios, Viana, Virgínia, Viviane, Wallace.

E a todos os outros que de alguma forma me ajudaram

AGRADECIMENTOS

- Aos colegas do curso de pós-graduação da Universidade de São Paulo,
- Aos coordenadores do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP,
- Aos professores do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da USP,
- À Dra. Maria Inês Sato, gerente do Departamento de Análises Ambientais da CETESB,
- Ao Lourival Affonso Klupel Wanke da regional da CETESB de Santana
- Aos funcionários e amigos da CETESB,
- À prof. Dra Maria Valnice Boldrin Zanoni e à Patrícia Carneiro do Instituto de Química da UNESP de Araraquara,
- Ao Dr. Harold Freeman do NCSU – College of textiles,
- À Dra. Maureen Sakazami e ao Dr. Caetano Mautone da SABESP,
- Aos Drs. Larry Claxton, Mike Kohan, Sarah Warren da *Environmental Protection Agency* (USEPA).

Este trabalho foi realizado na Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental (EAM) da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em convênio firmado com a Universidade de São Paulo. Contou, ainda, com a colaboração da *Environmental Protection Agency* (USEPA), North Caroline University – College of Textile, Unesp Araraquara (Instituto de Química).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 CORANTES AZÓICOS	02
1.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE TINGIMENTO	06
1.3 TOXICIDADE DE CORANTES AZÓICOS	10
1.4 MUTAGENICIDADE DE ÁGUAS NATURAIS E TRATADAS PARA CONSUMO HUMANO	14
1.4.1 Águas superficiais	14
1.4.2 Águas tratadas	17
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 Aparelhagem	23
3.1.2 Vidraria	24
3.1.3 Outros materiais	24
3.1.4 Reagentes	26
3.1.5 Meios de cultura e soluções	27
3.1.6 Esterilização e teste de esterilidade	30
3.1.7 Lavagem de vidraria	31
3.2 MÉTODOS	31
3.2.1 Coleta das amostras	31
3.2.2 Extração das amostras	31
3.2.2.1 Extração líquido-líquido	31
3.2.2.2 Extração por ultrassom	32
3.2.2.3 Extração por XAD-4	32
3.2.3 Teste de mutagenicidade	35

3.2.3.1 Preparo da placa mãe	36
3.2.3.2 Taxa de reversão espontânea	38
3.2.3.2 Procedimento do ensaio	38
3.2.3.2.1 Protocolo de microssuspensão	39
3.2.3.2.2 Protocolo de incorporação em placa	41
3.2.3.3 Interpretação de resultados e análises estatísticas	43
3.2.4 <i>Cloração do corante comercial preto</i>	44
3.2.5 <i>Análises cromatográficas</i>	45
3.2.5.1 Cromatografia à gás/espectrometria de massas	45
3.2.5.2 Cromatografia em camada delgada	46
3.2.5.3 Cromatografia em fase líquida	46
3.3 ÁREA DE ESTUDO	46
3.4 PONTOS DE AMOSTRAGEM E COLETA	51
4. RESULTADOS	55
4.1 CAPÍTULO 1 - CHEMICAL CHARACTERIZATION OF RAW AND TREATED EFFLUENTS FROM A DYE PROCESSING PLANT	59
4.2 CAPÍTULO 2 - EVALUATION OF THE PRESENCE OF MUTAGENIC DYES IN SEDIMENTS FROM CRISTAIS RIVER	75
4.3 CAPÍTULO 3 - A POSSIBLE NEW CLASS OF A MUTAGENIC DESINFECTION BY-PRODUCT GENERATED FROM THE REACTION OF AZO DYES AND CHLORIDE DURING THE PRODUCTION OF DRINKING WATER	86
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
6. REFERÊNCIAS	109
7. ANEXO	121
8. CURRÍCULO	132

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Lista de aminas aromáticas consideradas carcinogênicas de acordo com a Legislação Alemã, que levou a proibição do uso de alguns corantes (ETAD, 2002).....	13
TABELA 2. Lista dos benzotriazóis (PBTAs) e seus respectivos corantes precursores identificados até o momento	17
TABELA 3. Genótipo e tipo de mutação detectada pelas linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> utilizadas neste trabalho.....	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Principais estruturas de fibras naturais e sintéticas utilizadas por indústrias têxteis	03
FIGURA 2. Estrutura básica de corantes azóicos	05
FIGURA 3. Clivagem da ligação azo do corante C.I Acid Red 21 e a formação das aminas aromáticas correspondentes.....	12
FIGURA 4. Formação de compostos derivados do 2- fenilbenzotriazol (PBTAs)	15
FIGURA 5. Esquema de extração de amostras de água por XAD4 em pH natural e após acidificação das amostras.....	34
FIGURA 6. Esquema do teste de <i>Salmonella</i> / microssoma – método em microssuspensão	40
FIGURA 7. Esquema do teste <i>Salmonella</i> / microssoma – método de incorporação em placa	42
FIGURA 8. Equipamento de Kipp utilizado na geração de cloro para o procedimento de cloração do corante comercial preto (BDGP).....	45
FIGURA 9. Mapa da região metropolitana de São Paulo, localizando a bacia do Ribeirão dos Cristais.....	47
FIGURA 10. Diagrama unifilar da região do Ribeirão dos Cristais.....	50
FIGURA 11. Lançamento do efluente tratado da indústria de tingimento no Ribeirão dos Cristais	52
FIGURA 12. Ponto da captação da Estação de Tratamento de Água (ETA) de Cajamar	53
FIGURA 13. Local do lançamento do duto coletor de esgotos	53

RESUMO

As amostras ambientais coletadas na área do Ribeirão dos Cristais, região metropolitana de São Paulo, apresentaram atividade mutagênica sistemática durante os últimos anos. De acordo com estudos já publicados em literatura, essa contaminação estava relacionada ao lançamento de efluentes líquidos de uma indústria de tingimento neste corpo d'água. Essa indústria tingue principalmente nylon e poliéster, utilizando em seus processos azo corantes dispersos, entre outros. Os corantes de um produto comercial preto (BDCP), muito empregado por essa indústria, foram detectados recentemente em amostras ambientais coletadas nesse local e se mostraram pelo menos parcialmente, responsáveis pela mutagenicidade mencionada. Esses corantes foram identificados como C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 e C.I. Disperse Orange 37. A água tratada proveniente do Ribeirão dos Cristais também mostrou atividade mutagênica e esta foi relacionada tanto à presença de nitrocompostos aromáticos, incluindo policíclicos, quanto de produtos mutagênicos secundários formados durante a desinfecção.

Este trabalho teve como objetivos a caracterização química de amostras de efluente bruto e tratado, provenientes da indústria de tingimento, lançados no Ribeirão dos Cristais; a avaliação da presença dos corantes C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 e C.I. Disperse Orange 37 em amostras de sedimento antes e após o lançamento; e a verificação da possível formação de compostos mutagênicos incolores, provenientes dos corantes, a partir do processo de cloração, os quais poderiam explicar a mutagenicidade da água tratada.

As amostras de efluente bruto e tratado foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e os corantes do produto comercial preto (BDCP) foram detectados, dentre outros. Quando analisadas por Cromatografia em Fase Gasosa/Espectrometria de Massas (CG/EM) foram detectadas, preliminarmente, várias aminas aromáticas mutagênicas, dentre elas alguns produtos de clivagem dos corantes identificados. Os resultados indicaram que o tratamento empregado pela indústria (sistema de lodos ativados) não é eficiente na remoção desses compostos.

Nas amostras de sedimento do Ribeirão dos Cristais, coletadas após o lançamento da indústria de tingimento, foram detectados por CCD o corante C.I. Disperse Blue 373 e o

C.I. Disperse Orange 37, porém o corante violeta (C.I. Dispersse Violet 93) não foi detectado. A mutagenicidade das mesmas amostras foi avaliada com a linhagem YG1041 de *Salmonella*, com e sem S9 e a atividade mutagênica detectada pôde ser explicada pela presença dos corantes nas amostras avaliadas.

Tendo em vista que nas amostras de água tratada não foram detectados corantes, porém foi observada atividade mutagênica relacionada à presença de nitrocompostos, submeteu-se uma solução do produto comercial BDGP, em concentração compatível com aquela detectada na água bruta, à cloração em condições similares às aquelas realizadas pela Estação de Tratamento de Água (ETA). Após a cloração, foi verificada a formação de substâncias incolores, com atividade mutagênica e perfil cromatográfico semelhante ao apresentado por amostras de água tratada coletadas na saída da ETA. Desta forma, especula-se que as substâncias geradas possam estar relacionadas com a mutagenicidade detectada na água tratada.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que corantes azóicos e seus produtos relacionados são uma importante classe de contaminantes ambientais que deveriam ser melhor avaliados toxicologicamente, especialmente quanto a sua atividade genotóxica e carcinogênica tendo em vista o risco direto e indireto de exposição humana à esses compostos quando liberados para o meio ambiente.

ABSTRACT

Environmental samples collected at Cristais river area in the metropolitan region of São Paulo, had showed repeated mutagenic activity during the last years. According to published studies, this contamination was related to the discharge of a dye processing plant. This industry dyes mainly nylon and polyester, using azo disperse dyes, among others. Recently, the dye components of a black dye commercial product (BDGP), widely used by this industry, were detected in environmental samples collected in this area and were considered responsible, at least in part, for the cited mutagenicity. These dyes were identified as: C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 and C.I. Disperse Orange 37. The drinking water from the Cristais river also showed mutagenic activity related to the presence of nitro aromatic compounds, including polycyclic ones, as well as the usual disinfection by products.

The objectives of this work were: the chemical characterization of raw and treated effluent samples from the dye processing plant that discharges its effluent in Cristais river; the evaluation of the presence of C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 and C.I. Disperse Orange 37 in sediment samples before and after the discharge; and the evaluation of the possible generation of non-colored mutagenic compounds, derived from the dyes, during the disinfection step that could explain the mutagenicity of the drinking water.

The raw and treated effluent samples were analyzed using Thin Layer Chromatography (TLC) and the dye components of the BDGP were detected, among others. Several mutagenic aromatic amines, including cleavage by-products of the detected dyes, were preliminary detected using gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS). The results demonstrated that the treatment applied by the industry (activated sludge) was not efficient in the removal of these compounds.

In the Cristais river sediment samples collected downstream the dye processing plant discharge, we detected the dyes C.I. Disperse Blue 373 and C.I. Disperse Orange 37 using TLC, however, the violet component (C.I. Disperse Violet 93) was not detected. The mutagenicity of these samples were evaluated using the strain YG1041 of *Salmonella*, in the presence and absence of S9 and the mutagenic activity observed could be explained by the presence of the dyes in the samples.

Taking into account that dyes were not detected in drinking water samples, but the samples showed mutagenicity related to the presence of nitrocompounds, a solution of the commercial product (BDCP), at similar concentration found in raw water, was chlorinated using the Drinking Water Treatment Plant (DWTP) conditions. After the chlorination, the formation of non-colored substances was verified, and these compounds showed mutagenic and chromatographic profiles similar to the drinking water collected at DWTP. In this sense, we suggest that the generated substances could be related to the mutagenic activity previously detected in the drinking water.

The results obtained in this study demonstrated that azo dyes and related compounds are an important class of environmental contaminants that should be better evaluated in relation of its toxicity, mainly in relation to their genotoxic and carcinogenic effects, considering the direct and indirect human exposure risk associated to these compounds once in the environment.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 CORANTES AZÓICOS

O uso de corantes pela humanidade é bastante antigo, existindo relatos do hábito de colorir tecidos no Egito cerca de 3200 anos a.c e na Índia há 2000 anos a.c. Nessa época os corantes naturais, provenientes principalmente de plantas, predominavam e os processos de tingimento eram bastante rudimentares (BECHTOLD e col., 2003). Atualmente, a tecnologia de tingimento consiste de várias etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, considerações econômicas entre outras. Devido a exigências do mercado consumidor em relação à diversidade de cores e tonalidades, resistência da cor à exposição à luz, lavagem, transpiração, etc, estima-se que cerca de 10.000 tipos de corantes são produzidos em escala industrial, sendo cerca de 30% destes disponíveis para a indústria têxtil (GUARATINI & ZANONI, 2000).

As fibras têxteis podem ser divididas em naturais e sintéticas e as suas estruturas principais estão representadas na Figura 1. As fibras naturais mais utilizadas são baseadas em celulose (cadeias poliméricas de glicose) e proteína (polímero complexo composto por diferentes aminoácidos), as quais estão presentes na lã, seda, algodão e linho. As fibras sintéticas são comercializadas como viscose (xantato de celulose obtida da madeira), acetato de celulose (triacetato de celulose obtido da madeira), poliamida (condensação do ácido adípico e hexametileno diamina), poliéster (polímero do ácido tereftálico e etilenoglicol) e acrílico (polimerização da acrilonitrila) (GUARATINI & ZANONI, 2000).

FIGURA 1. Principais estruturas de fibras naturais e sintéticas utilizadas por indústrias têxteis (Modificado de GUARATINI & ZANONI, 2000).

Dessas fibras, as mais freqüentemente utilizadas pelas indústrias têxteis são algodão, nylon, acetato de celulose e poliéster (ASPLAND, 1997). Outra atividade importante é o tingimento de couros. Desta forma, a produção de corantes se concentra principalmente no atendimento a essa demanda.

A molécula do corante utilizada para tingimento de fibras pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra (KUNZ e col., 2002). Os corantes podem ser classificados de acordo com o grupamento cromóforo, sendo mais relevantes os compostos azóicos, antraquinonas, nitro e quinolinas (GREGORY, 1990) ou de acordo com o método pelo qual são fixados às fibras.

Os corantes azóicos são considerados como a classe química mais importante para a indústria de tingimento, com participação em cerca de 50-65% das formulações comerciais (CHUNG & STEVENS, 1993; ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY, 1993; KUNZ e col., 2002; RAFII e col., 1997). Além da aplicação têxtil, essa classe de corantes ainda é bastante utilizada pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (RAFII e col., 1997).

Quanto à forma de fixação à fibra, as principais classes de corantes estão listadas a seguir. Esta fixação geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver diferentes tipos de interações como: ligações iônicas, pontes de hidrogênio, Van der Waals e covalentes (GUARATINI & ZANONI, 2000):

- **Corantes reativos:** contêm um grupamento eletrofilico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas, e com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm as funções azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos.
- **Corantes diretos:** caracterizam-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose, etc.) através de interações de Van der Waals. Esta classe é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo (diazó, triazo, etc.) ou pré transformados em complexos metálicos.
- **Corantes ácidos:** Este termo corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, tendo grande importância no tingimento de fibras de poliamida e em fibras protéicas. Nessa classe estão incluídos compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketanimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação.

- **Corantes dispersivos:** Constituem uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão (partículas entre 1 a 4 micra). Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a formação originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa (finamente dividido) sobre o acetato de celulose. Usualmente o processo ocorre na presença de agentes dispersantes de cadeias longas que estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato com a fibra hidrofóbica. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tingimento de fibras sintéticas, tais como: acetato de celulose, nylon, poliéster e poliamida. (GUARATINI & ZANONI, 2000). Esta classe é constituída principalmente por corantes do tipo azóicos.

Os corantes estudados neste trabalho pertencem à classe dos dispersivos com função azóica, caracterizados como corantes orgânicos, insolúveis em água e que possuem pelo menos uma ligação azo (Figura 2), apresentando boa fixação em fibras naturais e sintéticas. No processo de tingimento de fibras com azocorantes, a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento (e.g. naftol) que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio (RN_2^+) provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado à fibra e produz um corante insolúvel em água. Assim, o corante é formado diretamente sobre a fibra, permitindo que este processo forneça bons resultados como alto padrão de fixação e alta resistência à luz e à umidade. Devido ao fato destes compostos serem insolúveis, agentes dispersantes são adicionados ao corante produzindo partículas finamente divididas. Essa mistura resulta em uma dispersão estável no banho de tintura (GUARATINI & ZANONI, 2000; USEPA, 1996).

A diversidade de estruturas químicas dos corantes é enorme, e as cores e propriedades variam de acordo com os grupos substituintes (Figura 2). Em 1993 já existiam cerca de 3000 tipos de corantes azóicos disponíveis para os vários ramos industriais (CHUNG & STEVENS, 1993).

FIGURA 2. Estrutura básica de corantes azóicos.

As indústrias de tingimento consomem cerca de 7×10^5 toneladas/ano de corantes e pigmentos em todo mundo (NIGAM e col., 1996), sendo 26.500 toneladas somente no Brasil (GUARATINI & ZANONI, 2000) e, segundo NAM & RENGANATHAN (2000) cerca de 10 a 15 % do total utilizado são perdidos durante o processo e liberados para o ambiente. Em 1985, MICHAEL & LEWIS apontaram que estudos relativos à presença de corantes em efluentes de indústria de tingimento eram escassos, provavelmente devido ao fato de que os corantes comerciais utilizados pelas indústrias são compostos de misturas de substâncias, muitas vezes de estrutura química desconhecida ou não publicada. Esta situação ainda persiste e, infelizmente, novos corantes são sintetizados, produzidos e utilizados sem serem adequadamente testados quanto à sua toxicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade. Sendo assim, a avaliação da qualidade de efluentes de indústrias de tingimento quanto à presença de corantes tem sido pouco realizada, apesar da grande quantidade dessas substâncias lançadas no meio ambiente.

1.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE TINGIMENTO

Atualmente, a contaminação de mananciais é um problema mundial, tendo em vista a tendência de escassez de fontes água próprias para consumo em futuro próximo. Segundo a Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (SABESP), em 2010 a demanda de água será superior à capacidade hídrica do estado (SABESP, 2004). Dentro deste contexto, o setor têxtil apresenta especial destaque, devido a seu grande parque industrial instalado utilizar grandes volumes de água e, conseqüentemente, gerar grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental (KUNZ e col., 2002; ROBINSON e col., 2001).

Os métodos mais utilizados para o tratamento de efluentes contendo corantes podem ser agrupados em três categorias: químicos, físicos e biológicos.

- Métodos químicos

Dos processos químicos de descoloração, os mais utilizados são os de oxidação, principalmente devido à simplicidade de aplicação.

O reativo de Fenton (H_2O_2 - Fe II) é um agente bastante efetivo no tratamento de efluentes contendo compostos resistentes ao tratamento biológico. A principal desvantagem deste método é a geração de lodo através da floculação do reativo com as moléculas do corante. Este lodo que contém contaminantes concentrados ainda tem que ser disposto adequadamente para proteção do meio ambiente. Normalmente são incinerados para produção de energia (ROBINSON e col., 2001).

O tratamento de efluentes contendo corantes por ozonização tem se mostrado eficiente na mineralização dos mesmos, sendo também eficiente na degradação de hidrocarbonetos clorados e aromáticos, fenóis e pesticidas, com a vantagem da não formação de lodo e sem metabólitos tóxicos. Esta forma triatômica de oxigênio se decompõe em oxigênio e em espécies radicalares, em solução aquosa, funcionando como um poderoso oxidante quando comparado a outros como H_2O_2 . É aplicado ao efluente sob a forma de gás, não aumentando o volume final de resíduo. A principal desvantagem dessa técnica é a baixa estabilidade do ozônio (cerca de 20 minutos) além do custo elevado prejudicar a implantação (GUARATINI & ZANONI, 2000; KUNZ e col. 2002; ROBINSON e col., 2001).

O método fotoquímico decompõe as moléculas de corante em CO_2 e H_2O por irradiação de luz ultravioleta em presença de H_2O_2 . Dependendo do material inicial, produtos de transformação, tais como metais, ácidos inorgânicos e orgânicos e aldeídos podem ser formados. Este método não gera lodo e os odores são drasticamente reduzidos. A luz ultravioleta ativa a decomposição da H_2O_2 em dois radicais, que oxidam o material orgânico (ROBINSON e col., 2001).

O método utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl) baseia-se no ataque da ligação azo da molécula do corante pelo Cl^+ . Este tratamento não é recomendável pois forma aminas aromáticas, muitas delas mutagênicas e carcinogênicas, provenientes do corante e geração de outros compostos, como os benzotriazóis descritos no item 2.2.1.

Recentemente foi desenvolvido o processo de destruição eletroquímica das moléculas de corante, no qual praticamente não se utiliza reagentes químicos e não gera

lodo. Os produtos de degradação formados não são tóxicos e podem ser lançados em corpos d'água sem impacto na qualidade da água (CARNEIRO e col., 2004; ROBINSON e col., 2001).

- Métodos físicos

A técnica de adsorção tem recebido destaque pela possibilidade de retenção de compostos químicos resistentes a tratamentos convencionais. Este processo produz resultados de alta qualidade e, na maioria dos casos, é economicamente viável.

O material mais comum é o carvão ativado, bastante efetivo na adsorção de vários tipos de corantes e pigmentos. A eficiência da técnica depende do tipo de carbono utilizado e das características do efluente. O carbono pode ser ativado posteriormente para utilização em novos processos, porém ao ativá-lo, 10 a 15% do material adsorvido é liberado, necessitando de disposição adequada. Além disso, esta técnica é de alto custo (ROBINSON e col., 2001).

A estrutura celular da turfa a torna um excelente adsorvente, com habilidade de reter alguns metais e compostos orgânicos presentes em efluentes de indústrias têxteis. Não necessita de ativação como o carvão e é de menor custo. Porém o carvão possui maior área superficial, sendo um adsorvente mais eficiente (ROBINSON e col., 2001).

O emprego de limalha de madeira pode ser utilizado como auxiliar na remoção de alguns tipos de corantes ácidos, porém não é tão eficiente e necessita de muito tempo de contato. Após o processo, esta madeira pode ser queimada para produção de energia (ROBINSON e col., 2001).

A sílica gel pode ser utilizada na remoção de corantes de caráter alcalino, embora reações adversas possam ocorrer, como reação da sílica com ar ou umidade (ROBINSON e col., 2001).

A filtração em membrana tem a capacidade de clarear, concentrar e principalmente separar corantes do efluente, mas essa técnica é incapaz de retirar material dissolvido. O resíduo após a filtração causa problemas de disposição, além de ser uma metodologia de alto custo. Pode ser aplicada em processos de reutilização de água dentro da indústria têxtil, se o efluente contiver baixas concentrações de corantes (ROBINSON e col., 2001).

- Métodos biológicos

Fungos capazes de degradar lignina, polímero estrutural encontrado em caule de plantas, têm se mostrado eficientes na degradação de substâncias químicas presentes em efluentes industriais resistentes ao tratamento convencional, principalmente o *Phanerochaete chrysosporium* (GOLD e col., 1988; KIRBY e col., 2000; KUNZ e col., 2002; ROBINSON e col., 2001). Esses fungos são capazes de degradar dioxinas, bifenilas policloradas (PCBs) e outros compostos orgânicos clorados, além de alguns corantes azóicos, sendo esta capacidade diretamente relacionada com a natureza dos grupos substituintes dos anéis aromáticos (KIRBY e col., 2000). As enzimas envolvidas na degradação dos corantes são as lignina peroxidases (LiP) e as peroxidases dependentes de manganês (MnP), além de enzimas produtoras de H_2O_2 , como a glicose-1-oxidase, glicose-2-oxidase, lacase e fenol oxidase (GOLD e col., 1988; KIRBY e col., 2000; KUNZ e col., 2002; ROBINSON e col., 2001).

Em uma pesquisa realizada em 2000, KIRBY e col. demonstraram a capacidade do fungo *Phlebia tremellosa* em promover a perda da cor de diferentes corantes têxteis, porém a perda de cor não significa mineralização dos compostos.

Culturas bacterianas de variados *habitats* também têm capacidade de descoloração de alguns corantes. Em uma revisão publicada recentemente, FORGACS e col., (2004) reportaram que a maioria das indústrias de tingimento utiliza o sistema de lodos ativados no tratamento secundário de efluentes líquidos, porém esse processo é ineficiente na remoção e/ou mineralização de corantes sintéticos devido à sua estabilidade química. Atualmente no estado de São Paulo, as indústrias de corantes e de tingimento têm utilizado esse sistema para o tratamento de seus efluentes. O tratamento por lodos ativados consiste na agitação de efluentes na presença de microrganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular grande parte da matéria orgânica, seguido de decantação e recirculação do lodo, produzindo um grande volume deste material (KUNZ e col., 2002). SHAL e col., (1991) estudaram 18 tipos de corantes azóicos, desses, 11 passaram pelo tratamento com lodos ativados praticamente inalterados, 4 (Acid Blue 113, Acid Red 151, Direct Violet 9 e Direct Violet 28) foram adsorvidos ao lodo e apenas 3 (Acid Orange 7, Acid Orange 8 e Acid Red 88) foram biodegradados. Um estudo realizado pela USEPA (1989), utilizando o corante azóico C.I. Disperse Blue 79, mostrou que, após o tratamento com lodos ativados, cerca de

85% do corante permanecia no sistema. Destes 85%, 3% eram retidos no lodo primário, 62% no lodo ativado e 20% era encontrado no efluente final.

A maioria dos tratamentos citados representa estudos de laboratório, porém a aplicação desses processos em escala real nem sempre é viável.

1.3 TOXICIDADE DE CORANTES AZÓICOS

Desde sua criação em 1974, a ETAD (*Dyestuffs Manufacturing Industry*) tem como objetivos a redução de danos ao meio ambiente, proteção de usuários e de consumidores e participação em estudos toxicológicos do Governo Americano sobre o impacto de seus produtos (ANLIKER, 1979). Cerca de 90% de 4000 corantes avaliados pela ETAD apresentaram valores de dose letal 50 (DL50) para ratos maiores que 2×10^3 mg/kg. Sendo os maiores valores atribuídos a corantes tipo azóicos (ROBINSON e col., 2001).

Porém, a exposição a alguns corantes azóicos tem sido relacionada ao desenvolvimento de câncer de bexiga, sarcomas esplênicos, hepatocarcinomas, anomalias celulares e aberrações cromossômicas (NONY e col., 1980; PATTERSON & BUTLER, 1982; PERCY e col., 1989; RAFII e col., 1997). Esses efeitos podem ser devidos à ação direta dos corantes nas células ou à formação de produtos de metabolismo decorrentes da redução da ligação azo. A azo redução em mamíferos é catalisada por enzimas hepáticas (MARTIN & KENNELLY, 1981) e por atividade da enzima azoredutase de bactérias intestinais, sob condições anaeróbias (JOACHIM e col., 1985; RAFII e col., 1997). Porém evidências indicam que a azo redução é mais relevante (CHUNG & STEVENS, 1993; CHUNG, 1992). Desta forma, o intestino delgado é um possível órgão alvo de carcinogênese pela exposição a corantes azóicos. Em ambos os casos, hidroxilaminas podem ser formadas, as quais são capazes de causar danos ao DNA. Se forem completamente reduzidas a aminas aromáticas ($-NH_2$), podem ser oxidadas novamente a *N*-hidroxiderivados por enzimas do sistema do citocromo P450. Esses radicais *N*-hidroxi podem ser, então, acetilados por *O*-acetiltransferases gerando íons eletrofilicos como o

nitrenium, capazes de reagir com o DNA (ARLT e col., 2002; BARTSCH, 1981; UMBUZEIRO e col., 2005).

Outro radical importante presente nos corantes azóicos é o NO_2 , o qual pode ser também reduzido pelas nitroredutases bacterianas ou por enzimas presentes no citoplasma de células de mamíferos, como as xantina oxidases, ou ainda o citocromo P450, pela via redutiva gerando radicais *N*-hidroxi (VOLKER e col., 2004). Estas e outras espécies mutagênicas similares àquelas descritas anteriormente podem também ser formadas, gerando de forma análoga, íons nitrenium (UMBUZEIRO e col., 2005).

Corantes a base de benzidina e/ou que produzem benzidina como produto de metabolização ou clivagem são classificados como carcinógenos humanos reconhecidos pelo Programa Nacional de Toxicologia dos E.U.A (NTP) e pela Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC) (IARC, 1975; NIH, 2002). Benzidina e/ou corantes à base de benzidina são metabolizados em vários produtos acetilados e hidroxilados, como *N*-acetilbenzidina, capazes de induzir adutos de DNA (DeMARINI e col., 1997). Estudos anteriores demonstraram correlação entre incidência de câncer de bexiga e exposição ocupacional a esses compostos em indústria de tingimento (ZHOU e col., 1997).

Vários estudos têm demonstrado que diversos azocorantes apresentam atividade mutagênica e genotóxica em testes com microrganismos e células de mamíferos (CLONFERO e col., 1990; FREEMAN e col., 1990; GARG e col., 2002; VENTURINI & TAMARO, 1979). A mutagenicidade dos corantes está intimamente relacionada com a natureza e posição dos substituintes ligados ao grupo azo (R e R' – Figura 2). Por exemplo, o 3-metoxi-4-aminoazobenzeno (3-OMe-AAB) é um potente hepatocarcinógeno para ratos e extremamente mutagênico para bactérias, enquanto o 2-metoxi-4-aminoazobenzeno (2-OMe-AAB) é aparentemente não carcinogênico e fracamente mutagênico (HASHIMOTO e col., 1977). Devido ao fato de pequenas mudanças na molécula de corantes alterarem drasticamente suas propriedades genotóxicas, é importante que cada corante azóico seja individualmente testado (UMBUZEIRO e col., 2005).

As linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas no teste de Ames pertencem ao grupo das enterobactérias que são capazes de produzir nitroredutases e azoredutase. Alguns corantes azóicos apenas exibem atividade mutagênica quando a ligação azo é reduzida e as aminas aromáticas formadas podem ser mais ou menos mutagênicas quando

comparadas ao corante original, dependendo de sua estrutura química (UMBUZEIRO e col., 2005). Se o corante azo tiver um ou mais substituintes do grupo nitro, nitroreduases endógenas irão reduzi-los a hidroxilaminas ou a aminas aromáticas, como citado anteriormente. As linhagens de *Salmonella* tradicionalmente utilizadas como a TA98, embora tenham capacidade de reduzir compostos do tipo nitro, têm menor atividade de nitroreduase do que a sua linhagem parental LT2. Esta atividade reduzida é devida à deleção de alguns dos genes responsáveis pela produção desta enzima (PORWOLLIK e col., 2001). Por isso, outras linhagens foram desenvolvidas; algumas incapazes de produzir essa enzima (TA98 NR e TA100 NR), e outras com alta produção da mesma (YG1021, YG1026). Resultados de testes empregando estas linhagens são úteis para o esclarecimento do envolvimento da via de redução do grupo nitro na mutagenicidade de certos compostos. Com esse mesmo objetivo, linhagens com deficiência de atividade de *O*-acetiltransferases (TA98 DNP6) ou com alta produção dessa enzima (YG1024 e YG1029) estão disponíveis. Além dessas, linhagens com alta produção de ambas as enzimas, nitrorreduases e *O*-acetiltransferase, foram desenvolvidas (YG1041 e YG1042). A combinação dessas linhagens pode auxiliar na elucidação do papel destas enzimas na atividade mutagênica de corantes azóicos. Assim, o teste de Ames, apesar de ser um teste bacteriano, é uma ferramenta importante capaz de prever os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria, com características metabólicas similares à flora intestinal de mamíferos (CHADWICK e col., 1992; CHUNG, 1992, UMBUZEIRO e col., 2005).

Na Alemanha, corantes que após clivagem geram uma ou mais aminas aromáticas consideradas carcinogênicas foram banidos (ETAD, 2002). A Tabela 1 apresenta a lista dessas aminas aromáticas. A Figura 3 ilustra a quebra da ligação azo de um corante com a conseqüente formação de aminas aromáticas, sendo a 6-metoxi-*m*-toluidina um carcinógeno.

FIGURA 3. Clivagem da ligação azo do corante C.I Acid Red 21 e a formação das amins aromáticas correspondentes.

Porém acredita-se que esta lista não seja exaustiva, pois várias outras amins aromáticas, que têm se mostrado positivas para o Teste de Ames ainda estão sendo estudadas em testes *in vivo*, desta forma, provavelmente esta lista irá aumentar.

TABELA 1. Lista de amins aromáticas consideradas carcinogênicas de acordo com a Legislação Alemã, que levou a proibição do uso de alguns corantes (ETAD, 2002).

Aminas aromáticas	Número CAS
4-aminobifenila	92-67-1
Benzidina	92-87-5
4-cloro- <i>o</i> -toluidina	95-69-2
2-naftilamina	91-59-8
<i>O</i> -aminoazotolueno	97-56-3
5-nitro- <i>o</i> -toluidina	99-55-8
<i>p</i> -cloroanilina	106-47-8
4-metoxi- <i>m</i> -fenilenediamina	615-05-4
4,4'-metilenedianilina	101-77-9
3,3' – diclorobenzidina	91-94-1
3,3' - dimetoxibenzidina	119-90-4
3,3' – dimetilbenzidina	119-93-7
4,4'-metilenedi- <i>o</i> -toluidina	838-88-0
6-metoxi- <i>m</i> -toluidina	120-71-8
4,4'- metilene bis (2-cloroanilina)	101-14-4
4,4'- oxidianilina	101-80-4
4,4'-tiodianilina	139-65-1
<i>o</i> -toluidina	95-53-4
4-metil- <i>m</i> -fenilenediamina	95-80-7
2,4,5- trimetilanilina	137-17-7

1.4 MUTAGENICIDADE DE ÁGUAS NATURAIS E TRATADAS PARA CONSUMO HUMANO

1.4.1 Águas superficiais

A presença de compostos mutagênicos na água bruta de diversos corpos de água é conhecida no mundo todo, e o teste de *Salmonella* tem sido considerado uma ferramenta

sensível na detecção dessas substâncias. Apesar dessa metodologia não identificar os contaminantes, a mutagenicidade total, expressa em revertentes por litro (rev/L), é um indicador do nível de atividade genotóxica presente em corpos d'água (UMBUZEIRO e col., 2001). Além disso, com o uso de técnicas diferenciais de extração e de diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, é possível identificar as classes dos contaminantes presentes nas amostras avaliadas.

VALENT e col. (1993), avaliando os rios do estado de São Paulo, obtiveram resultados positivos para o teste com *Salmonella* em 14% das amostras testadas, com potências variando entre 39 e 3650 revertentes/litro para a linhagem TA98. REHANA e col. (1995) na Índia encontraram atividade mutagênica nos rios avaliados, com potências variando entre 6330 e 10045 revertentes/litro para a TA98 na presença de ativação metabólica. Nesse caso, pesticidas pareciam ser os responsáveis por essa atividade mutagênica.

Alguns rios na Europa também apresentaram atividade mutagênica, como o Llobregat na Espanha, com 3880 revertentes/litro para TA98 com S9 (GRIFFOL e col., 1992) e os rios Po e Adige na Itália com potências de 380 e 210 revertentes/litro respectivamente com a mesma linhagem (GALASSI e col., 1992).

WHITE & RASMUSSEN (1998), estudando a mutagenicidade do rio Lawrence em Montreal e comparando com resultados obtidos em rios da Ásia e Europa, concluíram que atividades antropogênicas estão intimamente relacionadas com o efeito observado. O rio Danúbio em Viena, Áustria, apresentou 161 a 890 revertentes/g de Blue Rayon para a linhagem TA98 e 502 a 2014 revertentes/g para a linhagem YG1024. O Blue Rayon adsorve seletivamente compostos policíclicos e nessas amostras as aminas heterocíclicas IQ, Trp-P-1 e A alpha C foram detectadas, sendo responsáveis por 26% da mutagenicidade detectada (KATAOKA e col., 2000).

Recentemente, WATANABE e col., (2002) demonstraram que os rios Mawatari, Asuwa e Kitsune em Fukui no Japão, estavam altamente contaminados com compostos mutagênicos. Eles utilizaram a linhagem YG1024 e YG1021 e demonstraram que 87% das amostras analisadas eram mutagênicas e destas 29% apresentaram potências acima de 500.000 revertentes/g de Blue Rayon para a linhagem YG1024 na presença de ativação metabólica. Os autores relacionaram a mutagenicidade detectada à presença de uma nova

classe de benzotriazóis, derivada do 2-fenilbenzotriazol (PBTAs), a qual era responsável por pelo menos 50% da atividade mutagênica detectada.

SHIOZAWA e col., 1999 em estudos de síntese, demonstraram que os PBTAs são formados a partir da redução de corantes azóicos por hidrossulfito de sódio formando intermediários não clorados e após sucessivas etapas de cloração com ácido hipoclorítico, é gerado o PBTA, como pode ser verificado na Figura 4. No meio ambiente aquático, a presença dessas substâncias pode ocorrer, inicialmente, através do tratamento do efluente têxtil com hidrossulfito, utilizado para a remoção da cor, gerando os PBTAs não clorados (non CIPBTA). Esse efluente, agora sem cor, sendo enviado a uma estação de tratamento de esgoto municipal, que clora seus efluentes antes de liberá-los para os corpos d'água poderá gerar os PBTAs.

FIGURA 4 Formação de compostos derivados do 2-fenilbenzotriazol (PBTAs). Fonte: SHIOZAWA e col., 1999.

De acordo com SHIOZAWA e col., 1999 a atividade mutagênica dos PBTAs utilizando as linhagens TA98 e YG1024, na presença de ativação metabólica é cerca de 60 vezes maior que a atividade detectada para o corante original. Vários PBTAs diferentes já estão descritos na literatura, e suas estruturas químicas variam de acordo com o corante que os originou. Na Tabela 2 estão descritos os PBTAs estudados até o momento e seus corantes precursores.

MATSUOKA e col., (2001) demonstraram que os compostos PBTA1 e PBTA2 e seus respectivos corantes são citotóxicos para células de hamster CHL e V79-M, induzindo núcleos multilobulados e células binucleadas. Assim, provavelmente estes compostos não afetam somente o DNA, mas também proteínas estruturais e regulatórias envolvidas nos processos de divisão celular. Os autores sugerem que, devido às semelhanças estruturais entre os vários PBTA's, os outros compostos desta classe podem ter os mesmos efeitos (MATSUOKA e col., 2001).

TABELA 2. Lista dos benzotriazóis (PBTA's) e seus respectivos corantes precursores identificados até o momento.

PBTA's	Corante precursor	Nome comercial
PBTA1	2-[2-bromo-4,6-dinitrofenil]azo]-5-[bis(2-metoxietil)amino]-4-metoxiacetanilida	Não disponível
PBTA2	2-[2-bromo-4,6-dinitrofenil]azo]-5-[N-(2-cianoetil)etilamina]-4-metoxiacetanilida	Não disponível
PBTA3	2-[2-bromo-4,6-dinitrofenil]azo]-4-metoxi-5-[(2-hidroxietil)amino]acetanilida	Não disponível
PBTA4	5-amino-2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-amino-4-metoxiacetanilida	Não disponível
PBTA5	2-[2-bromo-4,6-dinitrofenil]azo]-5-[bis(2-acetoxietil)amino]-4-metoxiacetanilida	Disperse Blue 79:1 (CAS: 75497-74-4)
PBTA6	Produto de hidrólise do PBTA5	-
PBTA7	2-[2-bromo-4,6-dinitrofenil]azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida	Disperse Blue 291 (CAS: 56548-64-2)
PBTA8	2-[2-bromo-4,6-dinitrofenil]azo]-5-(dialilamino)-4-metoxiacetanilida	Disperse Blue 373 (CAS: 51868-46-3)

1.4.2 Água tratadas

Compostos genotóxicos encontrados em água tratada para abastecimento público podem ser oriundos de compostos presentes na água bruta e não removidos pelo

tratamento; ou ainda podem ser gerados através de reações químicas entre compostos não genotóxicos presentes na água bruta e substâncias utilizadas durante o processo de desinfecção. Desta forma, a qualidade das águas brutas captadas para abastecimento público após tratamento está intimamente ligada à qualidade da água fornecida para a população.

A desinfecção de água para abastecimento público é importante na prevenção de determinadas doenças, tais como febre tifóide, cólera, entre outras (KUSAMRAN e col., 2003). Por outro lado, a presença de compostos genotóxicos em água tratada é conhecida há muitos anos, e embora a contaminação das fontes com poluentes industriais, agrícolas e domésticos contribuam para a atividade mutagênica, a etapa de cloração da água durante o tratamento é responsável, pelo menos em parte, por esse efeito. Estudos já comprovaram que mutágenos são formados a partir da reação do cloro com substâncias orgânicas naturais, como substâncias húmicas, presentes em concentrações relativamente altas em água superficiais, formando produtos secundários de desinfecção, como os trihalometanos (THMs), 3-cloro-4(diclorometil)-5-5-hidroxi-2(5H)-furanona (MX), cloral hidrato e ácidos halogenados (KUSAMRAN e col., 2003; MEIER e col., 1983; MEIER, 1988; MONARCA e col., 1985), alguns deles já legislados na Portaria 518 (BRASIL, 2004).

O teste de mutagenicidade com *Salmonella* tem sido usado por vários autores na avaliação da qualidade de água tratada, utilizando as linhagens TA98 (*hisD3052*, *rfa*, Δ *bio*, Δ *uvrB*, pKM101) e TA100 (*hisG46*, *rfa*, Δ *bio*, Δ *uvrB*, pKM101). As linhagens com a mutação *hisG46* são recomendadas pois detectam substituição de pares de bases, que é o tipo de mutação mais freqüente causada pelos produtos secundários de desinfecção (KUMMROW e col., 2003; MEIER, 1988; SCHENCK e col., 1988; UMBUZEIRO e col., 2004). Porém, para que seja possível a detecção destes compostos são necessários procedimentos de extração e concentração específicos das amostras. Para amostras de água tratada utilizam-se resinas, como a XAD4 em pH ácido e em pH natural da amostra (KUMMROW e col., 2003; PELLIZARI e col., 1984). Devido à sua alta polaridade, os produtos secundários de desinfecção são preferencialmente adsorvidos à resina XAD quando o pH da amostra é 2 (KUMMROW e col., 2003; KUSAMRAN e col., 2003; RINGHAND e col., 1987). As amostras de água tratada contendo principalmente esses compostos são negativas para o teste com *Salmonella* quando a extração é realizada em pH

natural (MEIER e col., 1987). A maioria dos produtos secundários de desinfecção são mutágenos extraídos por resina XAD após acidificação da amostra a pH 2, detectados no teste com *Salmonella* com as linhagens TA98 sem adição de mistura S9 (ativação metabólica) e TA100 com e sem S9 (MEIER, 1988; MEIER e col., 1987; SCHENCK e col., 1998; VARTIAINEN & LIIMATAINEN, 1986).

Portanto, ao avaliar a mutagenicidade de águas tratadas é preciso levar em consideração a formação desses compostos antes de relacionar a atividade mutagênica total a compostos presentes anteriormente na água bruta (UMBUZEIRO e col., 2004).

UMBUZEIRO e col., (2004) em um estudo realizado no Ribeirão dos Cristais, região metropolitana de São Paulo, detectaram atividade mutagênica na água tratada fornecida para a população de Cajamar. Extraíndo amostras por XAD em pH ácido e em pH natural, os autores conseguiram diferenciar os produtos mutagênicos de desinfecção esperados, gerados pela reação de substâncias húmicas com cloro, daqueles provenientes de outras fontes. De acordo com o trabalho, essas outras substâncias mutagênicas estavam também presentes na água bruta e, provavelmente, seriam compostos nitroaromáticos e/ou aminas aromáticas, oriundos do lançamento de efluentes de uma indústria de tingimento no Ribeirão dos Cristais. Utilizando adicionalmente a técnica de extração por Blue Rayon, seletiva para compostos policíclicos (HAYATSU, 1992), e diferentes linhagens de *Salmonella* no teste de Ames, os autores concluíram que as amostras de água tratada coletadas após o tratamento na Estação de Tratamento de Água (ETA) de Cajamar estavam contaminadas com compostos mutagênicos nitroaromáticos policíclicos e/ou aminas aromáticas policíclicas (UMBUZEIRO e col., 2004).

Em estudo recente, utilizando amostras ambientais coletadas no mesmo local (efluente da indústria de tingimento, águas bruta e tratada e lodo da ETA), UMBUZEIRO e col. (2005) (Anexo I) detectaram corantes em todas as amostras analisadas, exceto na água tratada, porém a atividade mutagênica continuava sendo detectada. Os autores sugerem que compostos mutagênicos nitroaromáticos policíclicos incolores, relacionados à presença de corantes na água bruta, poderiam estar sendo formados durante o tratamento e não sendo removidos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Caracterização química de amostras de efluente industrial antes e após o tratamento da indústria de tingimento de tecidos que lança seus despejos no Ribeirão dos Cristais utilizando diferentes técnicas cromatográficas
2. Avaliação da presença de corantes em sedimentos e em organismos bentônicos coletados no Ribeirão dos Cristais antes e após o lançamento do efluente da indústria de tingimento
3. Verificação da formação de compostos mutagênicos oriundos da cloração de um corante comercial presente na água bruta do Ribeirão dos Cristais em condições similares à respectiva estação de tratamento de água (ETA).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1 Aparelhagem

- Agitador do tipo *vortex* (FISHER SCIENTIFIC- mod.232)
- Autoclave horizontal (BAUMER)
- Balança analítica (METTLER TOLEDO mod-AT201)
- Balança semi-analítica (METTLER TOLEDO mod-PB3002-S)
- Banho-maria (FANEM mod. 100)
- Banho seco (SYBRON/THERMOLINE mod 16525)
- Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical) (TROX TECHNIK – classe 2B)
- Capela de segurança química (COMTEC ENGENHARIA de LABORATÓRIO)
- Centrífuga com refrigeração (BECKMAN mod. J2-HS)
- Contador automático de colônias (ACCUCOUNT 1000 – BIOLOGICS)
- Cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas ion trap (VARIAN SATURN 2000)
- Cromatógrafo à líquido (SHIMADZU SCL-10AVP)
- Estufa para esterilização e secagem (FANEM mod. 320E)
- Estufa com exaustão e circulação interna de ar para secagem de amostras (FANEM mod.320E)
- Evaporador rotatório (BÜCHI)
- Freezer -20°C (ELETROLUX)
- Freezer -70°C (REVCO mod. ULT1386-7D29)
- Incubadora bacteriológica (REVCO mod. BOD50A14)
- Incubadora com agitação (NEW BRUNSWICK INC. SCIENTIFIC mod. G24)
- Máquina de lavar vidraria (LANCER)
- Placa aquecedora (CORNING mod PC-420)

- Potenciômetro(FISHER SCIENTIFIC- mod.15-077-8D)
- Refrigerador (ELETROLUX)
- Termômetros digitais de máxima e mínima (FISHER SCIENTIFIC- ACCUMET mod-15)
- Ultra purificador de água (USF-ELGA)

3.1.2 Vidraria

- Ampolas de Kuderna
- Balões de evaporação
- Beckers
- Beckers afunilados
- Colunas com placa porosa
- Cuba cromatográfica de vidro
- Erlenmeyers
- Frascos de coleta
- Frascos para preparo de meio de cultura
- Frascos para soluções
- Galões de 20L
- Pipetas
- Soxhlet
- Tubos de ensaio com tampa de teflon
- Tubos de ensaio de vidro descartáveis

3.1.3. Outros materiais

- Alças de inoculação
- Bico de Bunsen
- Coluna para cromatografia em fase gasosa CP-SIL*CB-MS (30m x 0,25um de filme interno)

- Coluna para cromatografia em fase líquida CLC-ODS (C-18)
- Cromatoplasmas em folhas de alumínio para cromatografia em camada delgada (Whatmann PE SIL G/UV, cat # 4410222, 20X20)
- Draga de Vanveen
- Estantes
- Filtros descartáveis para esterilização (MILLIPORE- 0,22 μ m)
- Frascos Eppendorf (0,5 mL)
- Gás nitrogênio ultra puro
- Lâmpada germicida (UV)
- Lâmpada UV 254 nm
- Luvas cirúrgicas
- Máscara de proteção respiratória contra gases
- Membranas de teflon (0,5 μ m)
- Microcapilares de 10 μ l
- Micropipetadores
- Óculos de proteção
- Papel de filtro
- Papel alumínio
- Parafilme
- Pera de sucção
- Pinças
- Pipetas plásticas descartáveis
- Placas de Petri descartáveis
- Porta-pipetas de aço inoxidável
- Protetor facial
- Resina amberlite XAD-4 (SIGMA)

3.1.4 Reagentes

- Acetato de etila (CARLO ERBA) P.A.
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (CARLO ERBA) P.A.
- Ácido clorídrico (HCl) P.A.
- Ácido nítrico (HNO_3) P.A.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A.
- Álcool etílico
- 2 Aminoantraceno - 2AA (SIGMA)
- Ampicilina (SIGMA)
- Bacto ágar (DIFCO)
- β - fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADP (SIGMA)
- D- Biotina (SIGMA)
- Caldo de soja e triptona (MERCK)
- Caldo nutriente n° 2 (OXOID)
- Cloreto de magnésio - $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (CARLO ERBA) P.A.
- Cloreto de potássio - KCl (MERCK) P.A.
- Cloreto de sódio - NaCl (MERCK) P.A.
- Cristal violeta (MERCK)
- Diclorometano- DCM (BURDICK & JACKSON) P.A.
- Dimetilsulfóxido - DMSO (SIGMA) P.A.
- Éter etílico (SYNTH) P.A.
- Fosfato de potássio dibásico - K_2HPO_4 (CARLO ERBA) P.A.
- Fosfato de sódio e amônio - $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ (FLUKA) P.A.
- Fosfato de sódio dibásico - Na_2HPO_4 (CARLO ERBA) P.A.
- Fosfato de sódio monobásico - NaH_2PO_4 (CARLO ERBA) P.A.
- Fração S9 (MOLTOX INC.)
- Glicose (MERCK)
- D-Glicose 6-fosfato (SIGMA)
- Hidróxido de sódio - NaOH (VETEC) P.A.

- L-histidina HCl (SIGMA)
- Metanol (MERCK) P.A.
- 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (SIGMA)
- 4-nitro-o-fenilene-diamina (4NOP) (ICN Biomedicals Ind.)
- Sulfato de kanamicina (INLAB)
- Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CARLO ERBA.) P.A.

3.1.5 Meios de cultura e soluções

- Meio de Vogel Bonner:

Composto por 10g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 100g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 175g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaH}_2\text{N}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 500g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e 1litro de água destilada morna. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho maria.

- Solução de glicose 10%:

20g de glicose são dissolvidos em 200mL de água destilada. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho-maria.

- Solução de ágar:

15g de ágar são dissolvidos em 180mL de água destilada. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho-maria. Esta solução deve ser esterilizada por 30 minutos.

- Solução de biotina e histidina 0,5mM

0,012g D-biotina e 0,011g de L-histidina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. Após esterilização por autoclave, a solução deve ser estocada em refrigerador.

- Ágar mínimo:

Este meio de cultura é composto por 200mL de solução de glicose 10%, 780mL de solução de ágar, 50mL de meio Vogel Bonner (50x) e 12mL de solução de biotina e histidina 0,5mM.

Caldo nutriente:

25g do caldo nutriente são dissolvidos em 1 L de água destilada. Volumes de 20mL são distribuídos em frasco com tampa de rosca, e submetidos à esterilização em autoclave.

- Ágar de superfície

6g de Bacto ágar e 5g de cloreto de sódio (NaCl) são dissolvidos em 1 L de água destilada. Volumes de 150 mL são distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos a esterilização em autoclave.

- Ágar Nutriente:

Este meio de cultura é composto de 25g de caldo nutriente, 15g de ágar e 1 litro de água destilada quente.

- Solução de biotina 0,5mM

0,012g de D-biotina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização em autoclave.

- Solução de histidina 0,5%

0,5g de L-Histidina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização em autoclave.

- Solução de ampicilina:

0,08g de ampicilina são dissolvidos em 10mL de hidróxido de sódio 0,02N. A esterilização desta solução deve ser feita por membrana filtrante de 0,22 μ m (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro.

Solução A

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

Material e Métodos

- Mistura S9 – 4% v/v

Cada 100mL de mistura S9 é composto por: 4mL de fração S9, 1mL de solução cloreto de potássio (KCl) 0,4M, 1mL de solução cloreto de magnésio (MgCl_2) 1,65M, 0,5mL solução de glicose-6-fosfato 1M, 50mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e 39,5mL de água destilada. Esta solução deve ser preparada assepticamente, e mantida sob refrigeração mesmo durante seu uso. Após 3 horas a solução excedente deve ser descartada.

Fração S9

Preparada a partir de microssomas de células de fígado de rato, tratado com o indutor enzimático AROCLOR 1254 e separado por centrifugação a 9000g. Adquirida liofilizada e armazenada a -20°C .

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

8,13g de cloreto de magnésio (MgCl_2) e 12,3g de cloreto de potássio (KCl) são dissolvidos em 100mL de água destilada. Após autoclavagem a solução deve ser mantida em refrigerador.

Solução de glicose-6-fosfato 1M:

Dissolver 2,821g de glicose-6-fosfato em 10mL de água destilada. Esta solução deve ser esterilizada por membrana filtrante de $0,22\mu\text{m}$ (MILLIPORE) e armazenada a -20°C .

Solução de NADP 0,1M:

0,7654g de NADP (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) são dissolvidos em 10mL de água destilada. Esta solução deve ser esterilizada por membrana filtrante de $0,22\mu\text{m}$ (MILLIPORE) e armazenada a -20°C .

- Tampão fosfato 0,2 M:

Solução A

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

Solução B

2,76g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) são dissolvidos em 100mL água destilada.

81mL da solução A e 19mL da solução B, são misturados e o pH ajustando para 7,4 com a solução A ou B. Após esterilização em autoclave estocar o tampão em refrigerador.

- Ágar mínimo para preparo de placas master:

Proceder conforme o preparo do Ágar Mínimo, substituindo a solução de biotina e histidina 0,5mM pelos compostos descritos na tabela.

Substâncias adicionadas aos meios de cultura

Substâncias	mg/litro
D-Biotina	0,66
L-Histidina	50,00
Ampicilina	25,20
Sulfato de kanamicina	25,20

3.1.6 Esterilização e teste de esterilidade

Todos os meios de cultura e soluções utilizados neste trabalho foram esterilizados em autoclave a 121°C (1 atm) por 20 minutos, a não ser quando especificado. A esterilização da vidraria foi feita em estufa a 180°C, por 2 horas. Todas as placas de Petri e pipetas descartáveis utilizadas foram adquiridas previamente esterilizadas por radiação γ - cobalto.

O teste de esterilidade foi realizado colocando os meios de cultura em estufa a 37°C por pelo menos 12 horas, sendo descartadas as placas que apresentassem qualquer tipo de crescimento.

3.1.7 Lavagem de vidraria

Todos os materiais utilizados foram descontaminados em autoclave a 121°C por 30 minutos e em seguida lavados com detergente neutro, enxaguados várias vezes e mantidos em solução de ácido sulfúrico/ ácido nítrico 30% (6:1) por 8 horas. Após esse período, o material era enxaguado 8 a 10 vezes com água corrente e posteriormente lavado uma vez com água ultrapura. Os materiais de vidro de volume não preciso eram secos em estufa a 170-180°C.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta das amostras

As amostras de água e efluente foram coletadas de acordo com APHA (1998). As amostras de sedimento foram coletadas com draga de Vanveer. Para a captura dos organismos bentônicos foram instalados dois substratos artificiais do tipo cesto preenchido com pedra de brita, em cada ponto de coleta, e deixados por 13 dias. A fixação e o preparo das amostras seguiram a Norma Técnica L5.309 (CETESB, 2003a).

3.2.2 Extração das amostras

3.2.2.1 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido das amostras de efluentes foi feita em pH 11 (adicionado NaOH 6N), em pH ácido (HCl 1:1 v/v) e em pH natural. Para todos os casos 80 ml de metanol / diclorometano (1:2,5) foram adicionados a 1L de efluente e agitados por 25 minutos (DUTKA e col., 1981). Tal procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os

extratos ácido e alcalino foram misturados, filtrados em membrana de teflon (0,5 μ m), concentrados em evaporador rotatório até cerca de 2-3 ml. Esse volume foi, então, transferido para tubo de ensaio estéril e seco sob fluxo de nitrogênio.

3.2.2.2 Extração por ultrassom

As amostras de sedimento foram secas em estufa a 45–50°C até se obter peso constante. Do sedimento seco foram retirados 30g que foram macerados com auxílio de grau e pistilo e transferidos para um béquer contendo 100 ml da mistura metanol/diclorometano (1:2,5). Essa mistura foi ultrassonicada por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um erlenmeyer. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e os sobrenadantes misturados, e o extrato final foi filtrado em membrana de teflon (0,5 μ m).

Após congelamento em freezer, as amostras de larva de *Chironomus* foram pesadas e trituradas com auxílio de grau e pistilo, e extraídas com mistura de metanol/diclorometano (1:2,5). A amostra coletada no ponto à jusante do lançamento da indústria, 10,88g, foi extraída com 30 ml da mistura de solventes e ultrassonicadas por 15 minutos. A amostra proveniente do ponto da captação da ETA, 18,38g, foram utilizados 60ml da mesma mistura de solventes. Em ambos os casos a extração foi repetida.

Os extratos das amostras de sedimento e das larvas foram concentrados em evaporador rotatório até cerca de 2-3 ml, transferidos para tubos de ensaio estéreis e secos sob fluxo de nitrogênio.

3.2.2.3 Extração por XAD-4

A resina Amberlite XAD4, polímero hidrofóbico de estireno-divinilbenzeno (DRESSLER, 1979), foi empregada para a extração de amostras de água bruta, pré clorada e tratada, bem como para as soluções do corante antes e após a cloração (item 4.3). A resina foi previamente lavada para retirada de impurezas provenientes do seu processo de fabricação, de acordo com JUNK e col., 1974 e PELLIZZARI, e col., 1984, com modificações.

Colunas de vidro com placa porosa e com torneira de teflon foram preenchidas com a resina. A quantidade de resina de cada coluna variou de acordo com o tipo e volume de

amostra, seguindo a proporção de 1mL de resina/L de amostra para a água bruta e pré clorada, 0,5mL de resina/L de amostra para água tratada e soluções de corante (item 4.3).

A extração foi realizada em pH natural (N) e em seguida as amostras foram acidificadas até pH inferior a 2 para a extração ácida (H^+), de acordo com KUMMROW e col. (2003).

As colunas contendo a resina foram conectadas através de tubos de vidro por um sistema de sifonagem a frascos contendo 100L das amostras. A amostra passou primeiramente através da coluna N num fluxo de 100mL por minuto e foi recolhida em frascos de 20L. Após a acidificação o mesmo processo foi realizado para a coluna H^+ , sendo a água final descartada. A Figura 5 ilustra o procedimento de extração por XAD em pH natural da amostra e após acidificação. Os extratos ácido e alcalino foram misturados, filtrados em membrana de teflon (0,5 μm), concentrados em evaporador rotatório até cerca de 2-3 ml. Esse volume foi, então, transferido para tubo de ensaio estéril e seco sob fluxo de nitrogênio.

FIGURA 5. Esquema de extração de amostras de água por XAD4 em pH natural e após acidificação das amostras.

3.2.3 Teste de mutagenicidade

O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, autotróficas para histina (*his*⁻), especialmente desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases do DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a capacidade de síntese desse aminoácido (MARON & AMES, 1983). Além dessa mutação em vários pontos do operon responsável pela biossíntese da histidina, as linhagens desenvolvidas para este teste apresentam características genéticas que permitem melhor detecção de variados tipos de mutágenos. A mutação *rfa* causa perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede bacteriana, permitindo a penetração de moléculas grandes na célula. A deleção de um dos genes do sistema de reparo por excisão, *uvrB*, e a presença do plasmídeo pKM101, marcado com o gene de resistência à ampicilina e contendo o gene *muc*, responsável pelo sistema de reparo passível de erro, facilitam a expressão de mutações.

Embora apenas este teste não seja capaz identificar os contaminantes, a mutagenicidade total é um indicador de atividade genotóxica presente em amostras ambientais. Além disso, a resposta obtida com linhagens de *Salmonella* sensíveis a diferentes grupos químicos, pode auxiliar na identificação da classe de compostos genotóxicos presentes nas amostras (UMBUZEIRO e col., 2004).

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, além das linhagens desenvolvidas para detecção de nitro-compostos YG1041 e YG1042, que possuem plasmídios com os genes da nitrorredutase e O-acetiltransferase, intensificando a metabolização desses compostos e elevando a resposta mutagênica em relação às linhagens parentais TA98 e TA100 respectivamente (HAGIWARA e col., 1993; MARON & AMES, 1983; UMBUZEIRO e col., 2005). Na Tabela 3 estão apresentados os genótipos e os tipos de mutações detectados pelas linhagens de *Salmonella* utilizadas neste trabalho. O teste é realizado na ausência e na presença de ativação metabólica pela fração microsossomal-S9, formada pelo homogenato de células de fígado de rato tratado com AROCLOR 1254, empregado para a indução de enzimas do sistema citocromo P450,

acrescida de cofatores (KRANENDONK e col., 2000; MAILLING, 1971). A mistura S9 foi preparada de acordo com MARON & AMES (1983), à 4% v/v.

TABELA 3. Genótipo e tipo de mutação detectada pelas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste trabalho.

Linhagem	genótipo	Tipo de mutação detectada
TA98	<i>hisD3052, rfa, Δbio, ΔuvrB</i> , pKM101	Deslocamento do quadro de leitura (principalmente deleção CG)
TA100	<i>hisG46, rfa, Δbio, ΔuvrB</i> , pKM101	Substituição de pares de bases do DNA
YG1041	<i>hisD3052, rfa, Δbio, ΔuvrB</i> , pKM101, com alta produção de nitroredutase e O-acetiltransferase (pYG233)	Deslocamento do quadro de leitura (principalmente deleção CG)
YG1042	<i>hisG46, rfa, Δbio, ΔuvrB</i> , pKM101, com alta produção de nitroredutase e O-acetiltransferase (pYG233)	Substituição de pares de bases do DNA

As linhagens utilizadas neste estudo foram continuamente testadas quanto à presença destas características, através do preparo de placas mãe.

3.2.3.1 Preparo da placa-mãe

As linhagens de *Salmonella typhimurium* foram armazenadas permanentemente em freezer a -70°C, em ampolas com 0,9mL de cultura e 0,1mL de dimetilsulfóxido como agente crioprotetor. As culturas para uso rotineiro foram mantidas em placas de ágar mínimo com biotina, histidina e ampicilina, em geladeira, denominadas “placas-mãe”.

As placas-mãe foram preparadas a cada dois meses e as características genéticas de cada linhagem foram previamente avaliadas como descrito abaixo.

Uma alíquota de cultura permanente foi inoculada em 20mL de caldo nutriente e, após 16 horas de incubação sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi estriada em placas de ágar nutriente para isolamento de colônias.

Após incubação por cerca de 66 horas a 37°C, foram escolhidas ao acaso 5 colônias isoladas de cada linhagem, e estas, inoculadas em 5mL de caldo nutriente, uma a uma.

Após incubação sob agitação a 37°C, inoculou-se cada cultura na forma de estrias grossas em placas de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e ampicilina, e após incubação, as placas foram seladas com parafilme e mantidas sob refrigeração.

Cada cultura crescida nos 5mL de caldo nutriente foi também inoculada através de zaragatoa esterilizados, em placas de ágar nutriente para verificação da presença da mutação *rfa*, do plasmídeo pKM101 e da deleção de *uvrB*.

Mutação rfa

Colocou-se discos de papel de filtro de 5mm de diâmetro embebido com 10µl de solução cristal violeta 1% no centro da placa de ágar nutriente inoculada. Após incubação, as linhagens contendo esta mutação apresentavam um halo de inibição de no mínimo 14mm ao redor do disco.

Plasmídeo pKM101

Com auxílio de uma alça de inoculação foram aplicadas cinco linhas de solução de ampicilina 20 mg/ml na placa de ágar nutriente inoculada. Após secar, a linhagem a ser testada foi estriada sobre a linha de antibiótico. Após incubação, as linhagens contendo esta mutação não apresentavam crescimento sobre a linha de antibiótico.

Plasmídeo pYG233

O procedimento é mesmo descrito para o plasmídeo pKM101, porém com utilização de solução de 20 mg/ml de sulfato de kanamicina como antibiótico.

Deleção uvrB

Metade de uma placa de ágar nutriente inoculada foi coberta com cartolina e irradiada com lâmpada germicida (ultravioleta 245nm) de 15 watts a uma distância de 33cm, por 15 segundos.

Após incubação, verificou-se que as linhagens mutantes cresceriam apenas na parte não irradiada (coberta) da placa.

3.2.3.2 Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100µl de cada cultura em 2,5mL de ágar de superfície mantido em banho-seco a 45°C, e vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. Cada cultura foi inoculada em duplicata.

A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 48 horas de incubação a 37°C e deveria estar dentro da faixa esperada para cada cepa.

Das 5 culturas analisadas de cada linhagem foram escolhidas duas com características genéticas adequadas, e delas, foram preparadas culturas permanentes. As placas-mãe correspondentes foram usadas como inóculo durante os ensaios, pelo período de 2 meses.

3.2.3.2 Procedimento do ensaio

A avaliação da atividade mutagênica das amostras foi feita utilizando dois protocolos: o desenvolvido por KADO e col., (1983), denominado de microssuspensão para as amostras de água, efluente e soluções do corante antes e após a cloração; e o desenvolvido por MARON & AMES (1983), ou método de incorporação em placa, para as amostras de sedimento.

3.2.3.2.1 Protocolo de microssuspensão

As culturas das linhagens foram inoculadas com alça de platina em 20mL de caldo nutriente, utilizando-se as placas master como fonte de inóculo. Após crescimento, por uma noite a 37°C sob agitação mecânica, as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

Os extratos obtidos de acordo com o item 3.2.2 foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes diluições. 5 µl de cada dose foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 50 µl de suspensão da linhagem (2×10^9 células), concentrada 5 vezes e 50µl da mistura S9. Nos testes realizados na ausência de ativação metabólica são colocados 50µl de tampão fosfato 0,2 M diluído 1:13. Essa solução foi homogeneizada e incubada a 37°C ($\pm 0,5$) por 90 minutos, em agitação. Após esse tempo, foram adicionados 2 ml de ágar de superfície (acrescido de biotina/histidina), vertendo-se em placa de petri contendo 20ml de ágar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37°C ($\pm 0,5$). O esquema abaixo ilustra o procedimento do teste.

FIGURA 6. Esquema do teste de *Salmonella*/ microsossoma – método em microssuspensão

Em todos os testes foi utilizado DMSO como controle negativo e os controles positivos nos testes sem S9 foram 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,125 µg/placa para a TA98 e TA100, 4-nitro-o-fenilene-diamina a 5µg/placa para a linhagem YG1041 e 2 nitrofluoreno para a linhagem YG1042. Para os testes realizados na presença de S9, os controles positivos foram: 2-aminoantraceno a 0,625 µg/placa para as linhagens TA98, TA100 e YG1042 e para a linhagem YG1041 foi utilizado este mesmo composto, porém na concentração de 0,03125 µg/placa.

A quantificação do número de revertentes é feita pela contagem do número de colônias que cresceram em meio mínimo após a exposição de uma população de células às amostras-teste.

3.2.3.2.2 Protocolo de incorporação em placa

Conforme procedimento apresentado no item anterior (3.2.3.2.1), as culturas das linhagens provenientes das placas-mãe foram inoculadas em caldo nutriente. Após crescimento as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

A tubos de ensaio, contendo 2 ou 3mL de ágar de superfície, previamente fundido e mantido a 45°C em banho seco, foram adicionados volumes de 100, 50 e 25µl do extrato correspondendo a diferentes doses equivalentes da amostra, 100µl de cultura de cada linhagem (10^9 células/mL) e para o ensaio na presença de ativação metabólica, 500µl da mistura S9. Após homogeneização em agitador tipo vórtex, o conteúdo do tubo foi vertido em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas por 66 horas a 37°C.

DMSO foi empregado como controle negativo e os controles positivos nos testes sem S9 foram 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,5 µg/placa para a TA98 e TA100, 4-nitro-o-fenilene-diamina a 10µg/placa para a linhagem YG1041 e 2-nitrofluoreno para a linhagem YG1042 a 10µg/placa. Para os testes realizados na presença de S9, os controles positivos foram: 2-aminoantraceno a 2,5 µg/placa para as linhagens TA98, TA100 e YG1042 e para a linhagem YG1041 foi utilizado este mesmo composto, porém na concentração de 0,0625 µg/placa.

A Figura 7 ilustra o esquema desse protocolo.

FIGURA 7. Esquema do teste *Salmonella*/ microsoma – método de incorporação em placa

O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador automático de colônias AccuCount 1000, BioLogics.

3.2.3.3 Interpretação de resultados e análises estatísticas

Em ambos os protocolos, o número de revertentes no controle negativo é a taxa de reversão espontânea obtida nas condições do ensaio. Ao tratarmos essa mesma cultura com doses crescentes de um agente ou mistura de compostos com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao aumento das doses de exposição, até um platô, no qual as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA ou, pela ação de outros compostos tóxicos presentes na amostra.

Espera-se, portanto, uma relação dose resposta entre o número de revertentes por placa e as doses de uma amostra com atividade mutagênica.

A análise de variância (ANOVA) é aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre o controle negativo e as doses aplicadas, seguida de regressão linear. A potência da amostra é expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. São várias as formas de expressão dos resultados, porém a inclinação da reta é sempre proporcional à potência da amostra. Em geral, diferenças significativas entre doses testadas e o controle negativo, e relação dose-resposta comprovada estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra, porém cada ensaio tem seu critério específico, normalmente baseado na sua reprodutibilidade e características intrínsecas das linhagens teste.

A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada para cada dose analisada, e é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos e induzidos) dividido pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos).

Neste trabalho, quando a ANOVA e a dose resposta foram significativas e o RM maior ou igual a 2, a amostra foi considerada positiva; em casos em que a ANOVA e a dose resposta foram significativas, porém o RM foi menor que 2, o teste era repetido, e se o resultado fosse reprodutível, o teste era considerado positivo. Caso não fosse possível repetir, o resultado era considerado como indícios de mutagenicidade. Foram considerados como resultados negativos os casos em que a ANOVA e/ou a dose resposta não foram significativos.

Para as análises de variância e ajuste dos dados, utilizou-se o programa denominado SALANAL, elaborado por MYERS do Integrated Laboratory Systems, Carolina do Norte, EUA, e por ele também gentilmente cedido.

A regressão linear foi avaliada utilizando uma variação do modelo linear, denominado truncagem tipo Bernstein (BERNSTEIN e col., 1982), que consiste na retirada de uma ou mais doses da análise usando somente os resultados que representam a porção linear da curva dose resposta.

3.2.4 Cloração do corante comercial preto

Esta parte do trabalho foi feita em colaboração com o Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara.

Foi utilizados o corante comercial preto, muito utilizado pela indústria de tingimento, e presente nas amostras ambientais do Ribeirão dos Cristais, denominado de BDCP, composto por três corantes: C.I. Disperse Blue 373, C.I Disperse Violet 93 e C.I Disperse Orange 37, de acordo com UMBUZEIRO e col., (2005) (Anexo 1). A cloração da solução do corante foi feita com cloro gás em condições similares às utilizadas pela Estação de Tratamento de Água de Cajamar. O gás foi gerado a partir da reação de 300 ml de ácido clorídrico concentrado cuidadosamente gotejados em 100 mg de permanganato de potássio (KMnO_4) contidos no equipamento de Kipp (Figura 7). O gás formado foi conduzido por uma mangueira e borbulhado em tubo de ensaio contendo 100 ml da solução de BDCP a 1 mg/l água ultra pura. Essas quantidades foram padronizadas para se obter 1,5 a 2 mg/l de cloro residual na solução, sendo essa a concentração de cloro livre exigida pela Legislação Brasileira para águas tratadas (BRASIL, 2004). O cloro residual foi medido através do método espectrofotométrico previamente padronizado por MOBERG & KARLBERG (2000), utilizando N,N'-dietil-*p*-fenildiamina (DPD) como reativo de cor.

FIGURA 8. Equipamento de Kipp utilizado na geração de cloro para o procedimento de cloração do corante comercial preto (BDGP).

3.2.5 Análises cromatográficas

3.2.5.1 Cromatografia a gás/espectrometria de massas

Esta parte do trabalho foi realizada pela Companhia de Saneamento Básico de São Paulo (SABESP).

A técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de massas (GC/MS) foi utilizada para avaliação preliminar da presença de aminas aromáticas em amostras de efluente bruto e tratado da indústria de tingimento.

Volumes de 1 μ l do extrato obtido conforme o item 3.2.2 foram injetados em um GC-MS ion trap (Varian Saturn 2000), munido de coluna CP-SIL*CB-MS (30m x 0,25mm de filme interno). A programação de temperatura foi: 60°C/1,53min - 130°C/28°C min⁻¹ - 180°C/12°C min⁻¹ - 240°C/7°C min⁻¹ - 300°C/10min. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1ml/min. A temperatura do injetor foi mantida a 250°C em modo *splitless*. O *mass range* variou entre 40 a 650 m/z a 0,5 sec/scan e os espectros de massas obtidos foram comparados com a biblioteca NIST. O peso molecular e o ponto de ebulição também foram considerados.

O volume de extrato injetado (1 μ l) foi equivalente a 0,1 ml de efluente bruto e tratado provenientes da indústria de tingimento.

3.2.5.2 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando folhas de alumínio revestidas por sílica gel com espessura de 250µm de filme (Whatmann PE SIL G/UV, cat # 4410222, 20X20). Como fase móvel foram empregados 10 ml de uma mistura de acetato de etila/tolueno (5:95). Volumes equivalentes a 1 litro de água bruta e tratada, 1 g de sedimento e o total extraído das larvas foram ressuspensos em 10µl de acetato de etila e aplicados à placa. Como parâmetro de comparação foram utilizados 10µl de uma solução do BDCP a 1mg/l em acetato de etila, aplicados nas placas cromatográficas juntamente com as amostras.

Após o desenvolvimento das placas, os cromatogramas foram visualmente observados e os rfs comparados com a solução de BDCP.

3.2.5.3 Cromatografia em fase líquida

Esta parte do trabalho foi feita em colaboração com o Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara.

Este método foi padronizado para obter separação dos picos dos componentes do corante comercial preto. Foram injetados 20 µl da solução de BDCP (1ppm), do produto clorado obtido no item 3.2.4 e extrato de água tratada no HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) munido de coluna CLC-ODS (C-18) e detector de arranjo de diodos. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila:água (85:15) com fluxo 1 ml/min. A temperatura do forno foi mantida a 40°C.

3.3 ÁREA DE ESTUDO

Em 1998 a Secretaria do Meio Ambiente (SMA) implantou oficialmente o teste de *Salmonella* no programa de Monitoramento da Qualidade de águas superficiais destinadas ao abastecimento público após tratamento. De acordo com os resultados, a maioria dos locais analisados forneceram respostas negativas para o teste de mutagenicidade, utilizando as linhagens TA98 e TA100 ou YG1042 com e sem ativação metabólica, demonstrando boa

qualidade dos corpos d'água do Estado de São Paulo, pelo menos no que diz respeito a este parâmetro (CETESB, 2003b).

O Ribeirão dos Cristais, localizado na região metropolitana de São Paulo (Figura 9), era uma exceção, apresentando sistematicamente resultados positivos para o teste com *Salmonella*. Esse local vinha apresentando resultados de atividade mutagênica que variavam entre 10^2 e 10^3 revertentes por litro, para a linhagem TA98 com e sem ativação metabólica (UMBUZEIRO e col., 2004). Esses valores são considerados de baixo a moderado de acordo com a classificação da atividade mutagênica desenvolvida para águas superficiais por UMBUZEIRO e col., 2001. De acordo com essa classificação, águas que apresentam até 500 revertentes/litro são consideradas como de baixa atividade mutagênica; 500-2500 moderadas; de 2500 a 5000, alta atividade e acima de 5000 consideradas como de atividade mutagênica extrema.

FIGURA 9. Mapa da região metropolitana de São Paulo, localizando a bacia do Ribeirão dos Cristais.

Além da atividade mutagênica, dados obtidos pela CETESB entre 1999 e 2002 constataram frequentes não conformidades nesse corpo d'água em relação a oxigênio

dissolvido (OD), fósforo total, coliformes fecais e clorofila, de acordo com a resolução CONAMA nº 20 (BRASIL, 1986). Foi também observada a presença de *Giardia* na água bruta da captação da ETA (CETESB, 2003b).

Na investigação de fontes de mutagenicidade, três possíveis responsáveis pela contaminação foram identificados: um presídio, uma indústria de tingimento e uma galvanoplastia. Em um estudo avaliando a mutagenicidade do efluente lançado por cada fonte, bem como amostras ambientais coletadas na região, concluiu-se que a fonte responsável pela atividade mutagênica detectada no Ribeirão dos Cristais era a indústria de tingimento de nylon e poliéster (UMBUZEIRO e col, 2004).

O despejo tratado desta indústria apresentou 100.000 revertentes por litro para TA98 sem S9 e até 300.000 com S9 (UMBUZEIRO e col., 2004), potências consideradas altas de acordo com a classificação de HOUK (1992). Como essa indústria utiliza principalmente corantes azóicos do tipo disperso e ácido, principalmente da classe dos azo compostos, suspeitou-se que a mutagenicidade poderia estar relacionada a utilização destas substâncias nos processos de tingimento. Convém ressaltar que após a identificação da fonte de atividade mutagênica na região, a indústria de tingimento responsável pelo despejo foi notificada e a eliminação da fonte de atividade mutagênica foi recomendada pelo órgão ambiental competente. A SABESP, responsável pela produção de água para abastecimento na região, foi notificada e como resposta iniciou as obras de um coletor para afastamento dos esgotos industriais e domésticos que impactam o ponto de coleta da ETA, que entrou em funcionamento em abril de 2004. Está prevista a construção de uma Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) para o devido tratamento dos despejos.

Além da fonte de atividade mutagênica já identificada, o motivo das outras não conformidades (baixo OD, fósforo e coliformes) estava relacionado ao lançamento de esgotos *in natura* de um presídio localizado a montante da indústria de tingimento e da captação.

O lançamento do efluente desta indústria de tingimento localiza-se a aproximadamente 6 km de distância do ponto de captação da Estação de Tratamento de Água (ETA) de Cajamar, que trata água para abastecimento público de 60.000 pessoas com produção de aproximadamente 100 litros/seg. A ETA utiliza um tratamento por pré cloração com cloro gás e flotação.

A água produzida pela ETA, em estudos anteriores, foi extraída por diferentes métodos e em seguida analisada pelo teste de Ames. Conforme apresentado anteriormente, foi possível identificar a presença de nitrocompostos policíclicos de natureza química ainda desconhecida (KUMMROW e col., 2003; UMBUZEIRO e col., 2004) bem como de aminas aromáticas (4-bromo-2,6-dicloro anilina; 3,4,5-trimetil anilina, entre outras), além dos esperados produtos secundários de cloração, como cloral hidratado, MX e ácidos halogenados oriundos da reação do cloro com matéria húmica (UMBUEIRO, e col., 2004).

A Figura 10 mostra o diagrama unifilar da região e a descrição dos pontos de coleta será apresentada no item 3.4.

FIGURA 6. Esquema do teste de *Salmonella*/ microsossoma – método em microssuspensão

Em todos os testes foi utilizado DMSO como controle negativo e os controles positivos nos testes sem S9 foram 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,125 µg/placa para a TA98 e TA100, 4-nitro-o-fenilene-diamina a 5µg/placa para a linhagem YG1041 e 2 nitrofluoreno para a linhagem YG1042. Para os testes realizados na presença de S9, os controles positivos foram: 2-aminoantraceno a 0,625 µg/placa para as linhagens TA98, TA100 e YG1042 e para a linhagem YG1041 foi utilizado este mesmo composto, porém na concentração de 0,03125 µg/placa.

A quantificação do número de revertentes é feita pela contagem do número de colônias que cresceram em meio mínimo após a exposição de uma população de células às amostras-teste.

3.2.3.2.2 Protocolo de incorporação em placa

Conforme procedimento apresentado no item anterior (3.2.3.2.1), as culturas das linhagens provenientes das placas-mãe foram inoculadas em caldo nutriente. Após crescimento as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

A tubos de ensaio, contendo 2 ou 3mL de ágar de superfície, previamente fundido e mantido a 45°C em banho seco, foram adicionados volumes de 100, 50 e 25µl do extrato correspondendo a diferentes doses equivalentes da amostra, 100µl de cultura de cada linhagem (10^9 células/mL) e para o ensaio na presença de ativação metabólica, 500µl da mistura S9. Após homogeneização em agitador tipo vórtex, o conteúdo do tubo foi vertido em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas por 66 horas a 37°C.

DMSO foi empregado como controle negativo e os controles positivos nos testes sem S9 foram 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,5 µg/placa para a TA98 e TA100, 4-nitro-o-fenilene-diamina a 10µg/placa para a linhagem YG1041 e 2-nitrofluoreno para a linhagem YG1042 a 10µg/placa. Para os testes realizados na presença de S9, os controles positivos foram: 2-aminoantraceno a 2,5 µg/placa para as linhagens TA98, TA100 e YG1042 e para a linhagem YG1041 foi utilizado este mesmo composto, porém na concentração de 0,0625 µg/placa.

A Figura 7 ilustra o esquema desse protocolo.

FIGURA 7. Esquema do teste *Salmonella*/ microsoma – método de incorporação em placa

O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador automático de colônias AccuCount 1000, BioLogics.

3.2.3.3 Interpretação de resultados e análises estatísticas

Em ambos os protocolos, o número de revertentes no controle negativo é a taxa de reversão espontânea obtida nas condições do ensaio. Ao tratarmos essa mesma cultura com doses crescentes de um agente ou mistura de compostos com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao aumento das doses de exposição, até um platô, no qual as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA ou, pela ação de outros compostos tóxicos presentes na amostra.

Espera-se, portanto, uma relação dose resposta entre o número de revertentes por placa e as doses de uma amostra com atividade mutagênica.

A análise de variância (ANOVA) é aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre o controle negativo e as doses aplicadas, seguida de regressão linear. A potência da amostra é expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. São várias as formas de expressão dos resultados, porém a inclinação da reta é sempre proporcional à potência da amostra. Em geral, diferenças significativas entre doses testadas e o controle negativo, e relação dose-resposta comprovada estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra, porém cada ensaio tem seu critério específico, normalmente baseado na sua reprodutibilidade e características intrínsecas das linhagens teste.

A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada para cada dose analisada, e é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos e induzidos) dividido pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos).

Neste trabalho, quando a ANOVA e a dose resposta foram significativas e o RM maior ou igual a 2, a amostra foi considerada positiva; em casos em que a ANOVA e a dose resposta foram significativas, porém o RM foi menor que 2, o teste era repetido, e se o resultado fosse reprodutível, o teste era considerado positivo. Caso não fosse possível repetir, o resultado era considerado como indícios de mutagenicidade. Foram considerados como resultados negativos os casos em que a ANOVA e/ou a dose resposta não foram significativos.

Para as análises de variância e ajuste dos dados, utilizou-se o programa denominado SALANAL, elaborado por MYERS do Integrated Laboratory Systems, Carolina do Norte, EUA, e por ele também gentilmente cedido.

A regressão linear foi avaliada utilizando uma variação do modelo linear, denominado truncagem tipo Bernstein (BERNSTEIN e col., 1982), que consiste na retirada de uma ou mais doses da análise usando somente os resultados que representam a porção linear da curva dose resposta.

3.2.4 Cloração do corante comercial preto

Esta parte do trabalho foi feita em colaboração com o Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara.

Foi utilizados o corante comercial preto, muito utilizado pela indústria de tingimento, e presente nas amostras ambientais do Ribeirão dos Cristais, denominado de BDCP, composto por três corantes: C.I. Disperse Blue 373, C.I Disperse Violet 93 e C.I Disperse Orange 37, de acordo com UMBUZEIRO e col., (2005) (Anexo 1). A cloração da solução do corante foi feita com cloro gás em condições similares às utilizadas pela Estação de Tratamento de Água de Cajamar. O gás foi gerado a partir da reação de 300 ml de ácido clorídrico concentrado cuidadosamente gotejados em 100 mg de permanganato de potássio (KMnO_4) contidos no equipamento de Kipp (Figura 7). O gás formado foi conduzido por uma mangueira e borbulhado em tubo de ensaio contendo 100 ml da solução de BDCP a 1 mg/l água ultra pura. Essas quantidades foram padronizadas para se obter 1,5 a 2 mg/l de cloro residual na solução, sendo essa a concentração de cloro livre exigida pela Legislação Brasileira para águas tratadas (BRASIL, 2004). O cloro residual foi medido através do método espectrofotométrico previamente padronizado por MOBERG & KARLBERG (2000), utilizando N,N'-dietil-*p*-fenildiamina (DPD) como reativo de cor.

FIGURA 8. Equipamento de Kipp utilizado na geração de cloro para o procedimento de cloração do corante comercial preto (BDGP).

3.2.5 Análises cromatográficas

3.2.5.1 Cromatografia a gás/espectrometria de massas

Esta parte do trabalho foi realizada pela Companhia de Saneamento Básico de São Paulo (SABESP).

A técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de massas (GC/MS) foi utilizada para avaliação preliminar da presença de aminas aromáticas em amostras de efluente bruto e tratado da indústria de tingimento.

Volumes de 1 μ l do extrato obtido conforme o item 3.2.2 foram injetados em um GC-MS ion trap (Varian Saturn 2000), munido de coluna CP-SIL*CB-MS (30m x 0,25mm de filme interno). A programação de temperatura foi: 60°C/1,53min - 130°C/28°C min⁻¹ - 180°C/12°C min⁻¹ - 240°C/7°C min⁻¹ - 300°C/10min. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1ml/min. A temperatura do injetor foi mantida a 250°C em modo *splitless*. O *mass range* variou entre 40 a 650 m/z a 0,5 sec/scan e os espectros de massas obtidos foram comparados com a biblioteca NIST. O peso molecular e o ponto de ebulição também foram considerados.

O volume de extrato injetado (1 μ l) foi equivalente a 0,1 ml de efluente bruto e tratado provenientes da indústria de tingimento.

3.2.5.2 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando folhas de alumínio revestidas por sílica gel com espessura de 250µm de filme (Whatmann PE SIL G/UV, cat # 4410222, 20X20). Como fase móvel foram empregados 10 ml de uma mistura de acetato de etila/tolueno (5:95). Volumes equivalentes a 1 litro de água bruta e tratada, 1 g de sedimento e o total extraído das larvas foram ressuspensos em 10µl de acetato de etila e aplicados à placa. Como parâmetro de comparação foram utilizados 10µl de uma solução do BDCP a 1mg/l em acetato de etila, aplicados nas placas cromatográficas juntamente com as amostras.

Após o desenvolvimento das placas, os cromatogramas foram visualmente observados e os rfs comparados com a solução de BDCP.

3.2.5.3 Cromatografia em fase líquida

Esta parte do trabalho foi feita em colaboração com o Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara.

Este método foi padronizado para obter separação dos picos dos componentes do corante comercial preto. Foram injetados 20 µl da solução de BDCP (1ppm), do produto clorado obtido no item 3.2.4 e extrato de água tratada no HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) munido de coluna CLC-ODS (C-18) e detector de arranjo de diodos. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila:água (85:15) com fluxo 1 ml/min. A temperatura do forno foi mantida a 40°C.

3.3 ÁREA DE ESTUDO

Em 1998 a Secretaria do Meio Ambiente (SMA) implantou oficialmente o teste de *Salmonella* no programa de Monitoramento da Qualidade de águas superficiais destinadas ao abastecimento público após tratamento. De acordo com os resultados, a maioria dos locais analisados forneceram respostas negativas para o teste de mutagenicidade, utilizando as linhagens TA98 e TA100 ou YG1042 com e sem ativação metabólica, demonstrando boa

qualidade dos corpos d'água do Estado de São Paulo, pelo menos no que diz respeito a este parâmetro (CETESB, 2003b).

O Ribeirão dos Cristais, localizado na região metropolitana de São Paulo (Figura 9), era uma exceção, apresentando sistematicamente resultados positivos para o teste com *Salmonella*. Esse local vinha apresentando resultados de atividade mutagênica que variavam entre 10^2 e 10^3 revertentes por litro, para a linhagem TA98 com e sem ativação metabólica (UMBUZEIRO e col., 2004). Esses valores são considerados de baixo a moderado de acordo com a classificação da atividade mutagênica desenvolvida para águas superficiais por UMBUZEIRO e col., 2001. De acordo com essa classificação, águas que apresentam até 500 revertentes/litro são consideradas como de baixa atividade mutagênica; 500-2500 moderadas; de 2500 a 5000, alta atividade e acima de 5000 consideradas como de atividade mutagênica extrema.

FIGURA 9. Mapa da região metropolitana de São Paulo, localizando a bacia do Ribeirão dos Cristais.

Além da atividade mutagênica, dados obtidos pela CETESB entre 1999 e 2002 constataram freqüentes não conformidades nesse corpo d'água em relação a oxigênio

dissolvido (OD), fósforo total, coliformes fecais e clorofila, de acordo com a resolução CONAMA nº 20 (BRASIL, 1986). Foi também observada a presença de *Giardia* na água bruta da captação da ETA (CETESB, 2003b).

Na investigação de fontes de mutagenicidade, três possíveis responsáveis pela contaminação foram identificados: um presídio, uma indústria de tingimento e uma galvanoplastia. Em um estudo avaliando a mutagenicidade do efluente lançado por cada fonte, bem como amostras ambientais coletadas na região, concluiu-se que a fonte responsável pela atividade mutagênica detectada no Ribeirão dos Cristais era a indústria de tingimento de nylon e poliéster (UMBUZEIRO e col, 2004).

O despejo tratado desta indústria apresentou 100.000 revertentes por litro para TA98 sem S9 e até 300.000 com S9 (UMBUZEIRO e col., 2004), potências consideradas altas de acordo com a classificação de HOUK (1992). Como essa indústria utiliza principalmente corantes azóicos do tipo disperso e ácido, principalmente da classe dos azo compostos, suspeitou-se que a mutagenicidade poderia estar relacionada a utilização destas substâncias nos processos de tingimento. Convém ressaltar que após a identificação da fonte de atividade mutagênica na região, a indústria de tingimento responsável pelo despejo foi notificada e a eliminação da fonte de atividade mutagênica foi recomendada pelo órgão ambiental competente. A SABESP, responsável pela produção de água para abastecimento na região, foi notificada e como resposta iniciou as obras de um coletor para afastamento dos esgotos industriais e domésticos que impactam o ponto de coleta da ETA, que entrou em funcionamento em abril de 2004. Está prevista a construção de uma Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) para o devido tratamento dos despejos.

Além da fonte de atividade mutagênica já identificada, o motivo das outras não conformidades (baixo OD, fósforo e coliformes) estava relacionado ao lançamento de esgotos *in natura* de um presídio localizado a montante da indústria de tingimento e da captação.

O lançamento do efluente desta indústria de tingimento localiza-se a aproximadamente 6 km de distância do ponto de captação da Estação de Tratamento de Água (ETA) de Cajamar, que trata água para abastecimento público de 60.000 pessoas com produção de aproximadamente 100 litros/seg. A ETA utiliza um tratamento por pré cloração com cloro gás e flotação.

A água produzida pela ETA, em estudos anteriores, foi extraída por diferentes métodos e em seguida analisada pelo teste de Ames. Conforme apresentado anteriormente, foi possível identificar a presença de nitrocompostos policíclicos de natureza química ainda desconhecida (KUMMROW e col., 2003; UMBUZEIRO e col., 2004) bem como de aminas aromáticas (4-bromo-2,6-dicloro anilina; 3,4,5-trimetil anilina, entre outras), além dos esperados produtos secundários de cloração, como cloral hidratado, MX e ácidos halogenados oriundos da reação do cloro com matéria húmica (UMBUEIRO, e col., 2004).

A Figura 10 mostra o diagrama unifilar da região e a descrição dos pontos de coleta será apresentada no item 3.4.

FIGURA 10. Diagrama unifilar da região do Ribeirão dos Cristais

3.4 PONTOS DE AMOSTRAGEM E COLETA

1. Córrego do Cedro

- Designação: tributário do Ribeirão dos Cristais, localizado dentro da fazenda Serra dos Cristais, no município de Cajamar.
- Características: profundidade menor que 1 m, localiza-se próximo à nascente do Ribeirão dos Cristais, área rural, afastada de fontes poluidoras industriais e apresentava menor grau de degradação. Este local foi considerado como ponto controle.

2. Presídio

- Designação: saída de lançamento de efluentes da penitenciária “Mario de Moura de Albuquerque” que abriga 2.500 presidiários.
- Características: O efluente é mantido em duas lagoas onde há aeração constante, sendo, então, lançado sem tratamento no Ribeirão dos Cristais.

3. Indústria de Tingimento

- designação: local de despejo de efluentes de indústria localizada a aproximadamente 6 km da Estação de Tratamento de Água.
- Características: Instalada há 20 anos na região. Indústria de tingimento de nylon e poliéster, que utiliza tratamento por lodos ativados, lançando 15 m³/h de efluente tratado no Ribeirão dos Cristais. Atende ao artigo 21 da Legislação Federal vigente (BRASIL, 1986) para os diferentes poluentes, porém apresenta alta atividade mutagênica (UMBUZEIRO et al., 2004).

FIGURA 11. Lançamento do efluente tratado da indústria de tingimento no Ribeirão dos Cristais

4. Galvanoplastia

- Características: fábrica de sistemas de refrigeração. Faz tratamento físico-químico de seus efluentes e seu despejo atende o artigo 21 da Legislação Federal vigente (BRASIL, 1986) para metais e outros poluentes, além de não apresentar atividade mutagênica (UMBUZEIRO et al., 2004).

5. Estação de tratamento de água (ETA) de Cajamar

- Designação: terceirizada da SABESP que capta água do Ribeirão dos Cristais para tratamento e abastecimento da população de Cajamar (60.000 pessoas). Nesse local o rio apresenta 9m de profundidade na época chuvosa e 1m na seca. Vazão de aproximadamente 340m³/h.
- Características: A água do ribeirão entra por gravidade na caixa de entrada da ETA. O tratamento utilizado consiste da aplicação de soda cáustica para correção do pH, pré cloração com cloro gás, aplicação de sulfato de alumínio (livre de ferro), floculação, coagulação e flotação. É importante ressaltar que no período noturno, o consumo de cloro aumentava significativamente e até o máximo da bomba era aplicado (500ppm), para que fosse atingido o cloro residual de 1,5 mg/L no final do processo.

FIGURA 12. Ponto da captação da Estação de Tratamento de Água (ETA) de Cajamar

6. Duto da SABESP

- Designação: local onde são despejados os efluentes. O duto foi construído pela SABESP para evitar a impactação da ETA, e entrou em funcionamento em abril de 2004.
- Características: Local onde é feito atualmente o lançamento dos efluentes das indústrias localizadas a montante da ETA.

FIGURA 13. Local do lançamento do duto coletor de esgotos

Material e Métodos

Para este trabalho as coletas foram realizadas nos pontos 1, 3 e 5, compreendendo amostras de águas brutas e tratadas, sedimentos e larvas de *Chironomus*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram organizados em quatro artigos científicos, sendo três apresentados sob a forma de Resultados e um anexo a esta tese (UMBUZEIRO e col., 2005).

O trabalho anexo, publicado na revista *Chemosphere* em janeiro de 2005, teve a participação da autora desta tese nas fases de elaboração do artigo, organização e discussão dos resultados. Neste manuscrito, os autores demonstraram a contribuição de corantes presentes no efluente de uma indústria de tingimento na mutagenicidade de algumas amostras ambientais coletadas na região do Ribeirão dos Cristais, sob influência desse despejo. A estrutura química dos corantes encontrados nessas amostras foi identificada e a mutagenicidade dos mesmos estudada.

Dentro desse contexto, três trabalhos foram produzidos com os resultados obtidos nesta tese, que são relacionados com o trabalho em Anexo.

O primeiro trabalho (Capítulo 1) apresenta a caracterização química de amostras de efluente bruto e tratado, lançado pela indústria de tingimento no Ribeirão dos Cristais. Foi realizada a otimização do método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), obtendo-se boa separação dos componentes do corante preto (BDGP), largamente utilizado pela indústria de tingimento em questão. Essa técnica foi empregada na detecção desses componentes nas amostras analisadas. Foi também realizada uma análise preliminar em uma das amostras para pesquisa de aminas aromáticas utilizando a técnica de Cromatografia a gás acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM), pela SABESP. Neste trabalho foi possível identificar os componentes do BDGP em todas as amostras avaliadas, bem como várias aminas aromáticas, dentre elas algumas parentais dos componentes do produto comercial preto (BDGP), mostrando que esses corantes e as aminas aromáticas são recalcitrantes ao tratamento por lodos ativados, empregado pela indústria. Dentre as diversas aminas aromáticas detectadas, incluem-se algumas consideradas carcinogênicas.

O segundo trabalho (Capítulo 2) pesquisa a presença dos mesmos componentes do BDGP em amostras de sedimento do Ribeirão dos Cristais e em organismos bentônicos que vivem nessa matriz. A técnica de CCD foi utilizada para a pesquisa dos corantes. Foi avaliada a atividade mutagênica das amostras de sedimento utilizando o teste com

Salmonella. Como esperado, o sedimento coletado no ponto controle não apresentou corantes e baixa atividade mutagênica foi detectada. Os componentes mutagênicos do corante BDCP foram detectados nos pontos localizados à jusante do lançamento dos efluentes da indústria e essas amostras apresentaram atividade mutagênica bem mais elevada que no ponto controle. Os resultados indicaram que a mutagenicidade detectada parece ser devida à presença de corantes mutagênicos no sedimento. Os corantes não foram detectados nas amostras de organismos bentônicos coletadas nos mesmos pontos, ou porque essas substâncias não são absorvidas pelas larvas, ou porque elas foram absorvidas e metabolizadas em compostos incolores, ou ainda, porque o método não foi suficientemente sensível para detectar os corantes.

No trabalho anexo os autores demonstraram que a água tratada pela ETA de Cajamar apresentava atividade mutagênica diferente daquela esperada para esse tipo de amostra, relacionada à presença de compostos mutagênicos incolores da classe dos nitrocompostos policíclicos, provavelmente gerados durante o tratamento da água, oriundos do lançamento da indústria de tingimento. Assim, no terceiro trabalho (Capítulo 3), foi realizada a cloração de uma solução do corante preto (BDCP) em condição semelhante à utilizada pela ETA para a verificação da possível formação de compostos mutagênicos provenientes dos corantes durante o tratamento. Foi também realizada a avaliação da mutagenicidade da solução resultante. Para avaliar o perfil cromatográfico das soluções do corante antes e após a cloração foi empregado um método em Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de Arranjo de Diodos (CLAE/AD), padronizado para separação dos componentes do BDCP. Essa parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com a UNESP - IQ, Araraquara. Verificou-se que a solução obtida após a cloração do BDCP apresentava perfil de mutagenicidade semelhante ao encontrado nas amostras de água tratada coletadas na saída da ETA de Cajamar. Na avaliação por CLAE/AD observou-se o desaparecimento dos picos relacionados aos componentes do BDCP após a reação com cloro, indicando modificação da estrutura química dos mesmos. Além disso, novos picos apareceram, sugerindo a formação de novas substâncias. Utilizando a técnica de CCD foi confirmada a presença dos componentes do BDCP nas amostras de água bruta e pré clorada, não sendo os mesmos detectados na água tratada. Os resultados de mutagenicidade sugerem que o composto gerado após a cloração

pertence ao grupo nitro, semelhante ao encontrado na água tratada. Dessa forma, especula-se que, durante o tratamento com cloro da água bruta contendo corantes, formam-se compostos mutagênicos incolores, provavelmente do grupo dos nitropolicíclicos, que não são removidos pelo tratamento.

4.1 - CAPÍTULO 1.

**CHEMICAL CHARACTERIZATION OF RAW AND TREATED EFFLUENTS
FROM A DYE PROCESSING PLANT**

Danielle Palma de Oliveira

USP – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580 Bl. 13-B,
São Paulo, SP, 05508-900, Brazil

Maureen Kazuko Sakagami

SABESP – Companhia de saneamento Básico de São Paulo, R. Conselheiro
Saraiva, 519, São Paulo, SP, 02037-900, Brazil

Gisela de Aragão de Umbuzeiro*

CETESB – Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da
Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Av. Prof. Frederico Hermann Jr.,
345, São Paulo, SP, 05459-900, Brazil

giselav@cetesb.sp.gov.br

***Corresponding author**

CHEMICAL CHARACTERIZATION OF A DYE PROCESSING PLANT EFFLUENT

ABSTRACT

Dyes used by textile processing plant can contaminate the aquatic environment, through the release of their effluents. We evaluated the presence of dyes using TLC technique in different effluent samples from a dye processing plant that discharges its effluent in the Cristais river. Also we performed a preliminary chemical characterization using GC/MS in one raw and treated effluent sample. The components of a black dye commercial product extensively used by the industry and several aromatic amines were detected in both raw and treated effluent, indicating that the industrial treatment was not efficient in the removal of these compounds.

Keywords: azo dyes, effluent treatment, Thin Layer Chromatography, Disperse Blue 373, Disperse Orange 37, Disperse Violet 93

1. INTRODUCTION

Dyes have been used for a long time ago. Colored drawings on the wall dated at 15,000-9,000 before Christ were found in Altamira cave in Spain (Berchtold et al., 2003). At this time, natural dyes, derived from vegetal or animal matter, were used. The first synthetic dye, Mauveine, was discovered in 1856, and after that, the scale and growth of the dye industry is linked to the development of textile industry (Encyclopedia, 1993).

Synthetic dyes exhibit considerable structural diversity. The chemical classes of dyes employed more frequently in industrial scale are the azo, anthraquinone, sulfur, indigo, triphenylmethyl and phthalocyanine derivatives (Forgacs et al., 2004). However, the majority of the synthetic dyes currently used in the industry are azo derivatives (Chung & Stevens, 1993; Forgacs et al., 2004).

Unfortunately, the amount of dyes produced in the world is not known. It is estimated to be over 10,000 tons per year. Exact data on the quantity of dyes discharged in the environment are also not available (Ekici et al., 2001). According to Nam & Rengathan (2001), 10-15% of the dyes used for coloring proposes are discharged in the environment. The important amounts of synthetic dyes released to the environment cause public concern, legislation problems and a serious challenge to environmental scientists. Several dyes can cause harmful effects to different organisms including humans (Anliker, 1988), and various are genotoxic in bacterial and mammalian tests (Venturini & Tamaro, 1979; Prival & Mitchell, 1982; Freeman et al., 1990).

Many dyes can not be detected in analytical routine techniques applied for environmental quality evaluation because they belong to different classes of compounds and the majority of them have unknown chemical structures. Therefore, it is difficult to choose the derivatization method to analyze them by Gas Chromatography. In this sense, the Thin Layer Chromatography (TLC) can be an alternative for the detection of dyes in environmental samples. It is a simple tool, and it does not require a revelation step because the colored compounds can be visually detected.

Umbuzeiro et al., (2004) reported that the effluent from a dye processing plant was responsible for the mutagenic activity detected in Cristais river, São Paulo, Brazil. And in 2005, Umbuzeiro et al., showed the contribution of a Black Dye Commercial Product (BDCP) widely used by this facility to the detected mutagenicity. They discovered that this

product was composed by three dyes: C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Orange 37 and Disperse Violet 93 (FIGURE 1) that were tested positive in the Salmonella assay (Umbuzeiro et al., 2005).

The objective of this work was to perform a chemical characterization of different raw and treated effluent samples from the dye processing plant cited above using different chromatographic techniques in order to evaluate the removal of dyes and related compounds during the industrial effluent treatment.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sample collection

We collected two raw and four treated effluent samples from the textile industry that dyes synthetic fibers such as polyester and nylon and releases its effluent in Cristais river. This dye processing plant uses activated sludge as effluent treatment. The samples were collected according to APHA (1998), and were representative of the industrial activities.

2.2 Extraction procedures

Volumes of 1L of water were extracted using the liquid-liquid technique with a mixture of methanol and methylene chloride in a proportion of 1:2.5 (Dutka et al., 1981). The extracts were reduced to 2-3 ml using a rotatory evaporator, transferred to small vials, and the volumes necessary to each test were separated and evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen.

2.3 Thin Layer Chromatography (TLC) analysis

- Optimization of the technique

Umbuzeiro et al., 2005, using TLC, employed ethylacetate:toluene 10:80 to separate the dye components of a black dye commercial product (BDGP) widely used by the dye processing plant analyzed in this study. In this study we tested different proportions of ethylacetate, toluene and ethanol as mobile phase and silica gel (Whatmann PE Sil G/UV, cat # 4410222, 250 μ m layer) as the stationary phase in order to optimize the separation of the dyes. The lowest observed limit (LOL) was also determined using successive dilutions

of a solution of BDCP at 100ug/ml, and 10ul of each dilution were spotted onto TLC plates.

- Sample analysis

For the effluent samples we used the best combination of solvents obtained in this study (ethylacetate: toluene, 5:95). We used the Black Dye Commercial Product (BDCP) as the chromatographic standard. We spotted volumes of 10 μ L containing the equivalent amount of 100 mL of each sample onto the same TLC plates described above. After development of the chromatograms, the plates were visually analyzed. For evaluation of fluorescent compounds we irradiated the plates with short wave UV light as already reported by Umbuzeiro et al. (2005).

2.4 Preliminary chemical characterization using GC/MS

Volumes of 1 μ L of one raw and one treated effluent extract, containing 0.1 mL equivalent of the original samples, were injected onto a CP-Sil*CB-MS, 30mx0.25 μ m column in a GC/MS ion trap (Varian Saturn 2000). Temperatures were 60°C/1.53 min - 130°C/28 min⁻¹ - 180°C/12 min⁻¹ - 240°C/7 min⁻¹ - 300 °C/10 min. Helium was used as carrier gas at 1mL/min. The mass scan range was 40 a 650 m/z at 0.5 sec/scan. The injector was in splitless mode at 250 °C. The mass spectra were compared to the NIST library.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 TLC analysis

We tested different mixtures of ethylacetate, toluene and ethanol and the best separation of the BDCP components was obtained using the proportion of ethylacetate/toluene at 5:95 which was used throughout this study. The lowest observed limit (LOL) for the technique was around 0.1 μ g/mL of BDCP (FIGURE 2), under the tested conditions. The TLC technique seems to be an important tool in the evaluation of the presence of dyes in those samples, mainly due to its sensitivity, considering the difficulty in analyzing them using other techniques.

In the one raw and in the three treated effluent samples analyzed using TLC, we detected the mutagenic dye components of the BDCP (C.I. disperse blue 373, C.I. Disperse

Orange 37 and C.I. Disperse violet 93), fluorescent compounds of unknown structures (FC1, 2 and 3) already reported by Umbuzeiro et al, 2005 and other unknown colored compounds. FIGURE 3 shows one of the TLC results for the raw and the respective treated effluent. The bands corresponding to the components of the BDCP were compared to a plate containing the chromatographic standard (BDCP) developed in parallel using exactly the same conditions. The presence of dyes in both treated and raw effluent demonstrated that the treatment applied by the industry was not efficient in the removal of dyes. Some studies have already demonstrated that activated sludge systems are not effective in removing azo dye present in industrial effluents (USEPA, 1989; Chung & Stevens, 1993, Ekici et al., 2001; Lise, 2002). Anaerobic processes seem to be more effective in the degradation of several dye compounds that do not degrade in activated sludge (An et al., 1996) but aromatic amines that can be even more harmful than the dyes themselves can be produced. Alternative treatment like ozonation or other strong oxidation process could be very important tools to efficiently mineralize azo dyes present in wastewater (Churchley, 1994; Garg et al., 2002).

3.2 Preliminary chemical characterization using GC/MS

Aromatic amines are usually the precursors of azo dyes. They can be generated by the cleavage of the azo bond or come along with the commercial product as contaminants. In this chemical characterization we detected a great variety of aromatic amines among other compounds (TABLE 1). The results were not confirmed with appropriate standards therefore they are preliminary findings. Some of the detected compounds were found in both raw and treated effluent, indicating that the treatment was also not efficient in the removal of those substances, including several aromatic amines. Among these amines, the majority are mutagenic to *Salmonella* and some of them are carcinogenic (NTP, 2004).

Germany followed by the European Union published a list with 22 aromatic amines classified as carcinogenic and banned the azo dyes that could form any of these amines after the cleavage of azo bond. In the raw effluent analyzed we preliminary detected 2-naphtylamine and p-chloro-o-toluidine, and in one treated effluent we found 2,4,5-trimethylaniline, all included in German Ban list (European Community, 2004). An aromatic amine considered carcinogenic to mice according to National Toxicology Program

(NTP, 2004), p-nitroaniline, was also detected in both raw and treated effluent. This fact is of great concern taking into account that the water of Cristais river is collected for public consumption after treatment, as discussed by Umbuzeiro et al (2005).

Efforts should be done to analyze those samples using standards and optimized extracting procedures in order to confirm our findings and to perform quantitative analyzes of the already detected aromatic amines. It is relevant to point out that some aromatic amines of the BDCP parental dye components were also found, like *N*-cyanoethyl aniline and 2,6 dichloro-4-nitroaniline, indicating the cleavage of the original dye during the dyeing process or the presence of them in the commercial products as contaminants.

4. FINAL CONSIDERATIONS

The detection of the dye components of the BDCP in all the samples analyzed by TLC shows that this commercial product is frequently used by the dye processing plant and it is recalcitrant to the aerobic treatment applied by the facility. Research is in progress in order to standardize the methodology for the quantification of those dye compounds in the effluent samples as well as in the environmental samples of Cristais river. This will allow the establishment of the conditions to better monitor the efficiency of the treatment plant. In the meantime the Thin Layer Chromatography technique at the conditions presented in this work can be a feasible tool to screen raw and treated dye processing effluents for azo dyes in a monitoring basis, because it is a low cost and fast methodology.

Studies should be encouraged to find economical feasible ways to better treat those effluents in order to protect humans and the biota against the possible adverse effects that the discharge of effluents containing mutagenic or carcinogenic dyes and aromatic amines can cause.

- Berchtold, I., Turcanu, A., Ganglberger, E., Geissler, S., 2003. Natural dyes in modern textile dyehouses – how to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future. *J. Cleaner Produc.*, 11, 499-509.
- Chung, K.T., Stevens, S.E., 1993. The reduction of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 2121- 2132.
- Churchley, J., 1994. Removal of dyes waste color from sewage effluent – the use of a full scale ozone plant. *Wat. Sci. Tecnol.*, 30, 275-284.
- Dutka, B.J., Jova, A., Brechin, J., 1981. Evaluation of four concentration/ extraction procedures on water and effluents collected for use with *Salmonella typhimurium*

Resultados

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Carlos Alberto Coimbrão and Célia Maria Rech from CETESB, Simone Valente Campos from USP, Caetano Mautone from SABESP, Larry D. Claxton from USEPA and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This article does not necessarily reflect the views of CETESB nor the SABESP and no official endorsement should be inferred. Approval does not signify that the contents reflect the views of the Agency, nor does mention of trade names or commercial products constitute endorsement or recommendation for use.

5. REFERENCES

- An, H., Qian, Y., Gu, X., Tang, W.Z., 1996. Biological treatment of dye wastewater using an anaerobi-oxic system. *Chemosphere*, 33, 2533-2542.
- Anlinker, R., Durig, G., Steinle, D., Moriconi, E.J., 1988. List of colorants to be classified as toxic. *J. Soc. Dye Col.*, 104, 223-225.
- APHA, 1998. Standard Methods for the examination of water and Wastewater, 20 th Ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Berchtold, T., Turcanu, A., Ganglberger, E., Geissler, S., 2003. Natural dyes in modern textile dyehouses – how to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future. *J. Cleaner Produc.*, 11, 499-509.
- Chung, K.T., Stevens, S.E., 1993. The reduction of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 2121- 2132.
- Churchley, J., 1994. Removal of dyes waste color from sewage effluent – the use of a full scale ozone plant. *Wat. Sci. Tecnol.*, 30, 275-284.
- Dutka, B.J., Jova, A., Brechin, J., 1981. Evaluation of four concentration/ extraction procedures on water and effluents collected for use with *Salmonella typhimurium* screening procedures for mutagens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 758-169.
- Ekici, P., Leupol, G., Parlar, H., 2001. Degradability of selected azo dye metabolites in activated sludge systems. *Chemosphere*, 44, 721-728.
- Encyclopedia of Chemical Technology, 1993. Dyes and Dye Intermediates, 8, 533-753, John Wiley & Sons.
- European Community, 2004. Available from: <www.cbi.nl/accessguide>.
- Forgacs, E., Cserháti, T., Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ. Int.*, 30, 953-971.
- Freeman, H.S., Esancy, J.F., Claxton, L.D., 1990. An approach to the design of nonmutagenic azo dyes: analogs of the mutagen CI Direct Black 17. *Dyes and Pigments*, 13, 5-77.
- Garg, A., Bhat, K. L., Bock, C.W., 2002. Mutagenicity of aminoazobenzene dyes and related structures: a QSAR/QPAR investigation. *Dyes and Pigments*, 55, 35-52.

- Lise, H.H., 2002. Non priority analysis of the wastewater streams of four dye manufacturing facilities. JWPCF, 62, 665-669.
- Nam, S., Renganathan, V., 2001. Non enzymatic reduction of azo dyes by NADH. Chemosphere, 40, 351-357.
- NTP National Toxicology Program, 2004. Available from: <www.ntp-server.niehs.nih.gov>.
- Prival, M.J., Mitchell, V.D., 1982. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. Mutat. Res., 97, 103-116.
- Umbuzeiro, G.A., Freeman, H.S., Warren, S.H., Oliveira, D.P., Terao, Y., Watanabe, T., Claxton, L.D., 2005. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. Chemosphere, *in press*.
- Umbuzeiro, G.A., Roubicek, D.A., Rech, C.M., Sato, M.I.Z., Claxton, L.D., 2004. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. Chemosphere, 54, 1589-1597.
- U.S. EPA, 1989. Aerobic and anaerobic treatment of C.I. Disperse blue 79. US Department of Commerce, National Technical Information Service (NTIS), I and II, EPA/600/2-89/051 (PB 90-111642).
- Venturini, S., Tamaro, M., 1979. Mutagenicity of anthraquinone and azo dyes in Ames *Salmonella typhimurium* test. Mutat. Res., 68, 307-312.

FIGURE 1. The chemical structures of the components of the Black Dye Commercial Product - Blue, violet and orange dyes (source: Umbuzeiro et al., 2005).

FIGURE 2. The lowest concentration observed for the Black Dye Commercial Product (BDCP), using successive dilutions of a solution at 100µg/ml of the BDCP at the applied Thin Layer Chromatography (TLC) conditions. The volume spotted of each dilution was 10µl.

FIGURE 3. Presence of different colored compounds, including the dye components of the Black Dye Commercial Product (BDCP), detected by Thin Layer Chromatography (TLC) in a raw (1) and treated (2) effluent sample.

TABLE 1. Preliminary chemical characterization of extracts of a raw and a treated effluent sample using GC/MS.

FIGURE 1

Blue Component of BDCP (C.I. Disperse Blue 373)
Violet Component of BDCP (C.I. Disperse Violet 93)
Orange component of BDCP (C.I. Disperse Orange 37)

FIGURE 2

FIGURE 3

TABLE 1

Compounds	CAS number	Effluent	
		raw	treated
2-naphtylamine	91-59-8	X	
2,6 dichloro 1,4 phenylenediamine	609-20-1	X	X
2,5-dihydro-2,5-dimethoxyfuran	332-77-4	X	
benzyl chloride	100-44-7	X	
N,N-dimethylbenzenemethanamine	103-83-3	X	
3-propyl phenol	621-27-2	X	
2-methyl phenol	95-48-7	X	
3,4- dimethylaniline	95-64-7	X	
phenol, p-methoxy	150-76-5	X	
benzene methane sulfonamide	4563-33-1	X	X
2,4,5-trimethylaniline	137-17-7		X
p-chloroaniline	106-47-8	X	
3-phenoxypropyl alcohol	6180-61-6		X
isoquinoline	119-65-3	X	
2-oxepanone 7 hexyl	16249-21-3	X	
4-aminophenol	123-30-8		X
2-ethyl quinoline	91-63-4	X	
2- naphylamine	91-59-8	X	
methyl anthranilate	134-20-3	X	X
5-chloro-o-anisidine	95-03-4		X
3- methyl quinoline	612-38-8	X	
2,4 dimethyl quinoline	1198-37-4	X	
p-chloro-o-toluidine	95-69-2	X	
p-nitroaniline	100-01-6	X	X
N-cyanoethyl aniline	1075-76-9	X	X
butylated hydroxytoluene	128-37-0	X	X
1,4 benzene diamine N,N diethyl	93-05-5		X

Resultados

naphtalenol	135-19-3	X	
benzene 4 butyl 1,2 dimethoxy	59056-76-7	X	
phenol 4-(1,1 dimethyl propyl)	80-46-6		X
p-nitroaniline	100-01-6	X	X
phenol 2,5 bis (1 methyl ethyl)	35946-91-9		X
2,6 dichloro-4-nitroaniline	99-30-9	X	X
nonylphenol	21154-52-3		X

4.2 - CAPÍTULO 2. Submetido ao Soil & Sediment Contamination

**EVALUATION OF THE PRESENCE OF MUTAGENIC DYES IN SEDIMENTS FROM
CRISTAIS RIVER**

Danielle P. de Oliveira¹, Mônica L. Kuhlmann² & Gisela A. Umbuzeiro²

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-900, São Paulo, Brazil; ² CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Av. Prof. Frederico Hermann Jr, 345, 05459-900, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Tel.: +55-11-3030-6531; Fax: +55-11-30306982; Email: dpalma@usp.br

EVALUATION OF THE PRESENCE OF MUTAGENIC DYES IN SEDIMENTS FROM CRISTAIS RIVER

ABSTRACT

Key words: azo dyes, mutagenicity assay, sediments, Thin Layer Chromatography, Salmonella

1. INTRODUCTION

Recently, a sediment sample collected in Cristais river, metropolitan region of São Paulo state, Brazil, where the water is taken for drinking water purposes after treatment showed mutagenic responses in the *Salmonella* assay (Umbuzeiro et al., 2004). In that study, the authors performed an investigation of sources of this contamination evaluating the mutagenic activity of different treated effluents discharged in Cristais river and an azo dye processing plant was considered responsible for this effect. Recently, Umbuzeiro et al (2005) chemically characterized environmental samples collected in Cristais river in order to evaluate the contribution of azo dyes in the cited mutagenic activity. Using Thin Layer Chromatography (TLC), the authors detected a black dye commercial product (BDGP) and other dyes in the following samples: treated effluent from the textile industry, raw water and sludge from the Drinking Water Treatment Plant (DWTP). Additionally all the samples analyzed showed mutagenic activity in the *Salmonella* assay, mainly with the strain YG1041. They also attributed the mutagenicity to the presence of the BDGP, which is composed by three azo dyes: C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 and C.I. Disperse Orange 37. These dyes, that belong to the group of the nitroaminoazobenzenes, were tested for mutagenicity and showed potencies for the strain YG1041 of 6,300 and 100 revertants/ μ g with and without S9 for the blue component; 4,600 and 195 revertants/ μ g with and without S9 for the violet component; and 280 and 160 revertants/ μ g for the orange component (Umbuzeiro et al., 2005).

Azo dyes are the most important class to textile industry, accounting for 50-65% of the commercial products (Chung & Stevens, 1993; Kunz et al., 2002; Rafii et al., 1997), and according to Nam & Rengantham (2001) approximately 10–15% of dyes used for coloring textiles might be lost in waste streams worldwide, contaminating the environment, including the

sediment. Maguire and Tkacz (1991) detected 15 different dyes in water, suspended solids, and sediment samples from the Yamaska River in Quebec, Canada, downstream from textile mill discharges. They chemically identified only 3 of the 15 dyes: C.I. Disperse Blue 79, C.I. Disperse Blue 26 and C.I. Disperse Red 60. The authors found the dyes in the sediment 5 km downstream at concentrations of 1 to 4 mg/kg. Yen, C-P.C et al (1991) studied the kinetics of the disappearance of 7 different commercial disperse dyes in sediments. For the nitroazobenzene dyes, the half-lives were on the order of hours, for the aminoanthraquinones, days and for quinolines, months. The azobenzene dyes were degraded by cleavage of the azo group to generate anilines and substituted phenylenediamines from the diazo component of the molecule. Weber and Adams (1995) studied the degradation of purified C.I. Disperse blue 79 in spiked sediments of different water bodies not impacted with xenobiotics. They showed that the dye was chemically reduced readily in the anoxic sediment. Half-lives were on the order of minutes to hours. Using treatment with sodium dithionite, they demonstrated that the azo bond and the nitro groups are susceptible to reduction. They predicted that C.I. Disperse Blue 79 undergoes reduction in natural anoxic sediments resulting in the subsequent release of potentially hazardous aromatic amines to the water column.

The benthic organisms, because they live in sediments, are able to absorb, metabolize, or accumulate toxic compounds (Ghen and White, 2004). Rust et al. (2004) showed that polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in the sediment are able to be metabolized by benthic invertebrate species like *Clymenella torquata*, *Nereis virens* and *Mya arenaria*.

The objectives of this work were the evaluation of the presence of dyes in sediment samples from Cristais river collected before and after the discharge of the dye processing plant effluent and correlate the presence of these dyes to the mutagenic activity of the sediment samples. We also analyzed benthic organisms (mainly *Chironomus* larva and Tubificidae worms) extracts for the presence of the same dyes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling

We collected sediment samples from three sites in Cristais river area, using a Ponar dredge, according to APHA (1998). Control site (Site 1), a tributary of Cristais river, not impacted by industrial discharges; Site 2, located downstream of the dye processing plant; and

Site 3, where water is taken by the Drinking Water Treatment Plant (DWTP), located ~ 6 km downstream from the dye processing plant discharge.

We collected benthic organisms using artificial substrate from sediment of Site 2 and 3 of Cristais River, according to CETESB (2003). In the sediment of site 1 the benthic organisms were found in small amounts, not sufficient to perform the chemical analysis.

2.2. Extraction procedures

Sediment samples were dried in the dark at 45-50°C, and aliquots of 30 g were extracted with 100 ml of methanol/dichloromethane (1:2.5) by ultrasonication, for 10 minutes, this procedure was repeated more two times (Grifoll et al., 1990). The extract was reduced to 2-3 ml using an evaporator, transferred to a small vial and evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen just before test.

The frozen benthic organisms from the Site 2 (10.88g) were extracted with 30ml of a mixture of methanol/dichloromethane (1:2.5) by ultrasonication, for 15 minutes, and this procedure was repeated more two times. For the sample from Site 3 (18.38g) we used 60 ml of the same mixture of solvents and a similar extraction procedure. Both extracts were reduced to 2-3 ml using an evaporator, transferred to a small vial and evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen just before testing.

2.3. Investigation of the presence of azo dyes

Thin Layer Chromatography (TLC) was used to evaluate the presence of dyes. Volumes of 10µl of extract in ethylacetate, equivalent to 1,0g of dry sediment and the whole extracts of benthic organisms, also resuspended in 10µl of ethylacetate, were spotted on aluminum plates retested with silica gel (Whatmann PE SIL G/UV, cat # 4410222, 20x20, 250 µm layer). The plates were developed using toluene:ethyl acetate (95:5). The chromatograms were evaluated by visual inspection and reference factors (rf) were compared with the chromatographic control, the Black Dye Commercial Product (BDGP). For evaluation of fluorescent compounds we irradiated the plates with short wave UV light as already reported by Umbuzeiro et al. (2005).

2.4. *Salmonella* mutagenicity assay

We used the standard plate incorporation *Salmonella* mutagenicity test performed according to MARON & AMES (1983) and CETESB (1993), using the strain YG1041, in the presence and absence of metabolic activation. This strain was chosen because it was considered the most sensitive for the samples already analyzed in that area (Umbuzeiro et al., 2004).

The extracts were resuspended in Dimethylsulfoxide (DMSO) and different doses of each extract were tested in triplicates and the maximum dose was 250 mg equivalent of dry sediment. After 66 hours of incubation at 37°C, the colonies were counted using an automatic counter. For the metabolic activation, Sprague Dawley rat liver S9 induced with Arochlor 1254 was used, and prepared at a concentration of 4% v/v according to MARON & AMES (1983), and maintained in ice during the experiment. The chemicals used as positive controls were 4-nitro-o-phenylene-diamine (Sigma) at 10µg/plate in the absence of S9, and 2-aminoanthracene (Sigma) at 0,0625 µg/plate in the presence of S9.

The background was carefully evaluated for toxicity using a stereomicroscope. Samples were considered positive when a significant ANOVA (analysis of variance) and a significant positive dose-response were obtained. The potencies were calculated using the Bernstein model (Bernstein et al., 1982) and the results were expressed in revertants/g equivalent of dry sediment.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Using the TLC method we identified two components of the Black Dye Commercial Product (BDCP), the Disperse Blue 373 and the Disperse Orange 37, in the sediment samples from site 2, located immediately downstream the effluent discharge and site 3 at the intake of the drinking water treatment plant (Figure 1). As expected, dyes were not detected at the control site, located upstream the discharge of the dye processing plant (Figure 1). We also detected fluorescent compounds, denominated FC1, FC2 and FC3 in the samples collected at site 2 and 3. These fluorescent compounds and the components of the BDCP were also present in the treated effluent, raw water and sludge of the drinking water treatment Plant (DWTP) from the same area prior analyzed by Umbuzeiro et al (2005).

Samples from site 2 and 3 presented high values of mutagenic activity when compared to the control site (Figure 2) for YG1041, especially in the presence of metabolic activation. Sample from site 2 presented 100 and 3.500 revertants/g equivalent of dry sediment without and with S9

respectively (Figure 2b). Sample from site 3 presented potencies of 1.200 and 5.000 revertants/g equivalent of dry sediment without and with S9. This mutagenicity could be explained by the presence of around 1 ug of the C.I. Disperse Blue 373 per g of sediment or 10 ug of the C.I. Disperse Orange 37 considering the potencies of these dyes. The presence of these dyes in sites 2 and 3 corroborate with the results obtained by Umbuzeiro et al (2005), that showed the contribution of the C.I. Disperse Blue 373 for at least 50% of the mutagenicity of the sludge sample analyzed. It seems that the C.I. Disperse Blue 373 and the C.I. Disperse Orange 37 are not readily degraded in the aquatic sediments of Cristais river, because they were found along the river, even 6 km after de discharge. On the other hand the C.I. Disperse Violet 93 was not found in the sediment samples analyzed, although it was found in the water samples from that area and in the sludge from the DWTP (Umbuzeiro et al. 2005). This dye could be faster degraded in the sediment than the others or have more affinity to the water than to the sediment. Other two additional sediments sampling were performed and again only the C.I. Disperse Blue 373 and the C.I. Disperse Orange 37 were detected (data not shown). Efforts should be done in order to identify the florescent compounds detected and their possible contribution to the mutagenicity of those samples, considering that they are present in all the environmental samples under the influence of this dye processing plant discharge.

We did not detect the presence of dyes or fluorescent compounds in the benthic organisms extracts from site 2 and 3. The dyes could have been absorbed and metabolized in non-colored compounds; or the organisms did not absorb them; or if they did the concentration were too low to be detected under the analytical conditions. More studies should be performed in order to understand the ability of absorption and metabolization of dyes by benthic organisms, considering that they are probably present in the environment in considerable amounts.

4. FINAL CONSIDERATIONS

The presence of two of the BDCP dyes along the river sediment denotes that they are able to adsorb to this matrix and are recalcitrant in the environment. Enforcement actions were already performed in this area, the industrial effluents are being collected and are no longer impacting the Drinking Water Treatment Plant intake area. We suggest that the sediment along the river should be monitored for the presence of dyes and mutagenic activity to evaluate how long they will last in the environment.

Considering the simplicity of the Thin Layer Chromatography technique applied in this work, we believe that this analysis could be performed in a routine basis for the verification of the presence of dye in sediments under the influence of dye processing plant discharges.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Carlos Alberto Coimbra, Célia Maria Rech and Francisco José Viana from CETESB, Larry Claxton from USEPA, Harold Freeman from NCSU, Fabriciano Pinheiro from USP and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for the helpful collaboration on this work. This article does not necessarily reflect the views of CETESB and no official endorsement should be inferred. Approval does not signify that the contents reflect the views of the Agency, nor does mention of trade names or commercial products constitute endorsement or recommendation for use.

5. REFERENCES

- APHA, 1998. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mut. Res.* 97, 267-81.
- Cetesb, 1993. Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – Teste de Ames. Norma Técnica CETESB L5.620, 38, 1993.
- Cetesb, 2003. Determinação de bentos de Água Doce – Macroinvertebrados. Método Qualitativo e Quantitativo. Norma Técnica L5.309, 14p. 2003.
- Chen G., White, P.A., 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat Res.*, 567, 151-225.
- Chung, K.T., Stevens, S.E., 1993. The reduction of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 2121-2132.
- Grifoll, M., Solanas, A.M., Bayona, J.M., 1990. Characterization of genotóxica components in sediments by mass spectrometric techniques combined with *Salmonella*/microsome test. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 175-84.
- Guaratini, C.C.I., Zanoni, M.V.B, 2000. Textile Dyes. *Química Nova*, 23, 71-78.
- Kunz, A., Peralta-Zamora, P., Moraes, S.G., Durán, N., 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, 25, 78-82.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- Nan, S., Renganathan, V., 2001. Non enzymatic reduction of azo dyes by NADH. *Chemosphere*, 40, 33-47.
- Rafii, F., Hall, J.D., Cerniglia, C.E., 1997. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 897-901.
- Rust A.J., Burgess R.M., McElroy A.E., Cantwell M.G., Brownawell B.J., 2004. Role of source matrix in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to deposit-feeding benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 2604-10.

- Umbuzeiro, G.A., Roubicek, D.A., Rech, C.M., Sato, M.I.Z., Claxton, L.D., 2004. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and defferent water extration procedures. *Chemosphere* 54, 1589-97.
- Umbuzeiro, G. A.; Freeman, H.S.; Warren, S.; Oliveira, D.P.; Terao, Y.; Watanabe, T.; Claxton, L.D., 2005. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais river. *Chemosphere*, *in press*.
- Weber, E. J., Adams, R.L., 1995. Chemical and sediment mediated reduction of the azo dye Disperse blue 79. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1163-70.
- White, P.A., Rasmussen, J.B., Blaise, C., 1996. Sorption of organic genotoxins to particulate matter in industrial effluents. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27, 140-51.
- White, P.A., Rasmussen, J.B., Blaise, C., 1998. Genotoxic substances in the St. Lawrence system In: Industrial genotoxins sorbed to particule matter in the St. Lawrence, St. Maurice, and Saguenay Rivers, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 286-303.

Figure 1. Evaluation of the presence of dyes in sediment samples collected in Cristais river at the control site (1), at the site located downstream of discharges from a dye processing plant (2) and at the intake of Drinking Water Treatment Plant (3) compared with the black dye commercial product (BDCP).

Figure 2. Mutagenicity detected in the sediments extracts using the strain YG1041. Control site (A); at the site located downstream of discharges from a dye processing plant (B) and at the intake of Drinking Water Treatment Plant (C).

4.3 - CAPÍTULO 3. To be submitted to *Environmental Science and Technology*

A POSSIBLE NEW CLASS OF A MUTAGENIC DESINFECTION BY-PRODUCT
GENERATED FROM THE REACTION OF AZO DYES AND CHLORIDE DURING
THE PRODUCTION OF DRINKING WATER

DANIELLE P. OLIVEIRA^{*1}, PATRÍCIA A. CARNEIRO², CÉLIA M. RECH³, MARIA
VALNICE V. ZANON², LARRY D. CLAXTON⁴, GISELA A. UMBUZEIRO³.

* Corresponding Author phone: 55 0XX11 3030 6531 fax: 55 0XX11 3030 6982

e-mail: dpalma@usp.br

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil,

² Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, R. Francisco Degni, s/n, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

³ CETESB – Cia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345, 05459-900, São Paulo, SP, Brazil

⁴ US EPA- Mail Drop B143-06, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC, 27709 USA

ABSTRACT

1. INTRODUCTION

The disinfection of water used for drinking and recreational purposes is necessary in order to destroy pathogenic organisms and prevent waterborne infection diseases (1-5). Along with the benefits of water disinfection, the formation of undesirable disinfection by-products (DBPs) is well recognized (3,4,6-9). Disinfectants like chlorine and ozone react with natural inorganic and organic matter in water, such as fulvic and humic acids, which are naturally present in raw waters, generating genotoxic and carcinogenic compounds (10-13). Among these DBPs, several toxicants (like chlorinated and brominated acetic acid, trihalomethanes and chloral hydrate) present in drinking water are already regulated (14)(WHO, 2004).

Besides natural matter, numerous xenobiotics released into surface waters can contaminate drinking water. It is known that several industrial facilities discharge toxic and genotoxic substances that are present in their effluents (15). Included among the industries that generate mutagenic wastes are dye processing plants. (15). Dyes could be the cause of this activity, because several of them are genotoxic (16-20). Azo dyes, that are characterized by one or more azo bond ($R-N=N-R'$), account for 65% of the dyes used in textiles, rubber products, plastics and printing inks (21). Great quantities of azo dyes are released into the aquatic environment, according to Nam and Renganathan (22), with up to 10-15% of the dyes used for coloring textiles being lost in waste streams.

Recently, a novel class of mutagenic compounds was isolated in rivers in Japan, accounting, in some cases, for at least 50% of the mutagenic activity detected in the water bodies (23-28). Those compounds, the 2-phenylbenzotriazole derivatives (PBTAs), are derived from different dinitrophenyl azo dyes. The dyes are converted to non-chlorinated derivatives of the PBTA compounds (non-CIPBTA) in which the NO_2 group is reduced to NH_2 by treatment with reducing reagents such as sodium hydrosulfite during the treatment of dye processing plant effluents. The chlorinated PBTA compounds are formed from the non-CIPBTAs by chlorination reagents such as sodium hypochlorite during the sewage treatment process (23,25-27,29,30). According to Shiozawa et al. (25), the mutagenic activity of PBTAs, detected with the strain TA98 and YG1024 of *Salmonella typhimurium*

in the presence of metabolic activation is ~ 60 times greater than the corresponding parental azo-dye. A study performed with PBTA1, PBTA2 and related azo dyes showed that these compounds are cytotoxic for Chinese hamster lines CHL and V79-MZ, inducing multilobed nuclei and binucleated cells. This study suggests that these compounds affect not only DNA, but also structural and regulatory proteins involved in cell division (29).

Cristais river in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, was contaminated by mutagenic effluents released by a dye processing plant located 6Km upstream from a Drinking Water Treatment Plant (DWTP)(19,31). In this area, the river water, sediment, drinking water and DWTP sludge showed mutagenic activity (31). A black dye commercial product (BDCP) was, at least partially, responsible for the mutagenic activity detected in all these samples, except for the drinking water (19). But the results obtained with *Salmonella* assay using nitroreductase and O-acetyltransferase overproducing strains and different extraction procedures indicated that all samples, including the drinking water, showed mutagenic activity that was related to the presence of nitropolycyclic compounds (31).

Considering that colored compounds (dyes) were not found in the drinking water, but the samples showed mutagenic response, we hypothesized that some compounds derived from the azo dyes were being formed during the drinking water disinfectant treatment and not being removed. Therefore, the objective of this work was to verify if the pre-chlorination step of the treatment was generating a mutagenic non-colored compound, derived from azo-dyes, particularly from the dye components of the BDCP, known to be present in the raw water. In order to elucidate that, we used the following strategy:

- Chlorination of the Black Dye Commercial Product (BDCP) solution and the analysis of the resultant compounds by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
- Evaluation of the mutagenic activity of the chlorinated BDCP.
- Verification of the presence of the BDCP dye components and evaluation of the mutagenicity of raw, pre-chlorinated, and drinking water samples from Cristais river.
- Comparison of the chemical and mutagenic profile of the chlorinated BDCP solution with the water samples analyzed.

2. MATERIAL AND METHODS

Chlorination of the Black Dye Commercial Product (BDCP) and evaluation of chromatographic profile using HPLC/Diode Array

Chlorination of commercial product.

We hypothesized that the pre-chlorination step applied by the DWTP to water from the Cristais river was generating a non-colored mutagenic compound derived from the reaction of chloride with the dye components of the contaminant BDCP. Previous efforts had shown that BDCP contained three azo dyes: C.I Disperse Blue 373, C.I Disperse Violet 93, and C.I Disperse Orange 37 (Figure 1) (20). In order to verify this possibility, we performed a chlorination of a solution of the BDCP cited above, simulating the pre-chlorination step of the treatment applied by the DWTP. Briefly, this treatment consisted of: pH correction with the application of NaOH, pre-chlorination with chloride gas (Cl_2), addition of aluminium sulfate, flocculation, coagulation and flotation. The final concentration of residual free chloride in treated water is 1.5 mg/l as required by Brazilian Federal Law (32) (Brasil, 2004). The solution of BDCP was prepared at 1 mg/l, within the concentration range expected to be found in raw water of the Cristais river, in Milli-Q water and chlorinated with chloride gas (Cl_2). We used a Kipp equipment containing 100mg of potassium permanganate, adding carefully 300ml of hydrochloric acid (HCl) (33) to allow the formation of Cl_2 that was introduced in the solution of the BDCP. The quantity of Cl_2 applied was adjusted to produce a final concentration of free chloride of 1.5 mg/l. The quantification of free chlorine was performed using the N,N'-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) spectrophotometric method according to Moberg and Karlberg (33).

HPLC analysis.

The conditions of the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were optimized to detect the three components (detected as violet, orange and blue components) of the BDCP. We analyzed the BDCP solution and the resultant chlorinated solution. We injected 20 μ l of each solution in a CLC-ODS (C-18) column coupled in a Shimadzu SCL-10AVP with a diode array detector. The mobile phase was acetonitrile:water (85:15) at 1ml/min. The oven temperature was isotherm at 40°C. We also analyzed a drinking water sample extracted by XAD4, and compared the obtained chromatograms.

Evaluation of the mutagenic activity of the resultant chlorinated BDCP solution and the raw, pre-chlorinated, and final drinking water samples

Sample collection and extraction procedures.

We collected raw, pre-chlorinated, and drinking water samples from Cristais River DWTP. We also collected samples of raw and treated water from a control site (31), not impacted by industrial effluents, both according to APHA, 1998. Volumes of 100 L of each sample were extracted with Amberlite XAD4 (Sigma) at natural pH (N) and after acidifying with HCl to pH 2 in order to allow the recovery of the disinfection by-products generated by the reaction of fulvic and humic acids with chlorine (31,34,35). The eluates were reduced to 2-3 ml using an evaporation, transferred to small vials, and evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen (Figure 2). We performed the same extraction procedure to concentrate the chlorinated BDCP solution.

Salmonella mutagenicity assay.

The *Salmonella* mutagenicity test was performed using the microsuspension method (36). To evaluate the solution of the resultant chlorinated BDCP solution extract, we used the strains TA98 (HisD3052, rfa, Δ bio, Δ uvrB, pKM101) and the nitroreductase and o-acetyltransferase overproducing strain, YG1041, which is derived from TA98, in the presence and absence of S9 mix containing 4% (v/v) lyophilized Aroclor-1254-induced rat liver S9 fraction (Moltox Inc.) and cofactors. The dried extract was resuspended in DMSO just before the test. Five different doses at minimum dose of 0.1 ml equivalent and maximal dose of 30ml equivalent were tested in duplicate. For the environmental samples, the experiments were conducted using the strains YG1041 and YG1042 (HisG46, rfa, Δ bio, Δ uvrB, pKM101, acetyltransferase and nitroreductase overproducing enzyme activity) strains of *Salmonella typhimurium* in the presence and absence of S9 mixture. A strain with *HisG46* was included because the expected DBPs cause preferentially base pair substitution mutations (31,34,37,38). The dried extracts were resuspended in DMSO and five doses were tested (at maximal dose of 200 ml equivalent per plate), in triplicate. Positive controls were 4-nitroquinoline-1-oxide (Sigma) at 0.125 μ g/plate for TA98, 4-nitro-o-phenylene-diamine at 0.25 μ g/plate for YG1041 and 2 nitrofluorene at 25 μ g/plate for YG1042 without S9 respectively; and 2-aminoanthracene (Sigma) at 0.03125 μ g/plate for

these strains with S9. Results were statistically analyzed using the Salanal computer program, with the Bernstein model (39) , and expressed as revertants/l equivalent of water.

Evaluation of the presence of disperse dyes by Thin Layer Chromatography. In this experiment, volumes of 0.5l equivalent of water were dried, resuspended in 20 μ l of ethylacetate and spotted onto TLC plates (Whatman PE SIL G/UV, 250 μ m layer). We used the BDCP as the standard for chromatographic comparison, spotting 1 μ l of a solution of 2.5 μ g/ μ l in ethylacetate together with the samples. The plates were developed in a TLC chamber containing 10 ml of a mixture of toluene:ethylacetate (95:5) as mobile phase. After the development, the plates were dried at room temperature, observed by visual inspection and the Reference Factor (rf) values were recorded and compared to the BDCP standard solution.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic profile and mutagenic activity of BDCP and the chloride solution.

Comparing the HPLC chromatograms, we observed that the three components of BDCP were not detected after the chlorination process, but other peaks appeared (Figure 3). These results demonstrate that the chemical structures of dye components were altered after the reaction with chlorine and different substances were generated.

According to Umbuzeiro et al (19) the BDCP is mutagenic with a potency of 1,570 rev/ μ g and 76 rev/ μ g for YG1041 with and without S9, respectively. Although we did not detect the dyes in the chlorinated solution, mutagenic activity was still detected, both with TA98 and YG1041 in the absence and presence of S9 (Figure 4). Considering the great increase of the potency obtained with the YG1041 in relation to the parental strain TA98, we can suggest that non-colored generated compound(s) likely belongs to the class of nitroaromatics and/or aromatic amines (19,31).

Because the dye color is lost, we can surmise that the chloride is attacking the chromophore group of the dye components of the BDCP. Also, a benzotriazole compound, similar to the PBTAs, may be formed. However, in this case, the NO₂ group is not being reduced; therefore, the formed compound could be a nitrobenzotriazole. The generated compound does not belong to any of the PBTAs previously tested in Salmonella assay, because they need metabolic activation to be mutagenic. The compound generated in this study has direct-acting activity, with TA98 and PBTAs are negative with TA98 –S9 at a concentration 500 μ g/plate (data not shown). Therefore, it could be difficult to relate the observed activity with this compound. Also, we did not detect any reduction condition during the treatment of water that could explain the formation of the non-CIPBTAs. Another possibility is that the azo bond is being reduced and nitro aromatic amines or a benzimidazole are being formed. However, one would expect that reductive conditions would be needed for the occurrence of these reactions (40).

Evaluation of the presence of dyes and mutagenic activity of environmental samples. Using the TLC technique, we detected the components of BDCP only in raw and pre-chlorinated water samples collected in Cristais river. The levels of the dyes detected in

the pre-chlorinated water was lower than in the raw water, indicating degradation is occurring also in the real ecological situation (Figure 5). This is compatible with the presence of BDCP in the sludge samples already reported by Umbuzeiro et al (19). In a study performed in the same region, Umbuzeiro et al (19) did not detect dyes in drinking water sample analyzed.

When we examined the mutagenic response of the drinking water produced by Cristais river DWTP, we observed the presence of mutagenic compounds detected with YG1041 with and without S9. This would include the mutagenicity generated by other expected disinfection by-products (DBP) (Figure 6) that are generated by the reaction of Cl_2 with humic and fulvic substances. Others have usually detected this mutagenic activity with TA100 (HisG46 mutation) (37,38,41) and/or its derivative strain, YG1042 (19).

When comparing the chromatograms B and C of Figure 3, we can observe the same peaks appearing in the chlorinated BDCP solution and the drinking water samples. Because these common chromatogram peaks appear and the same pattern of mutagenicity is observed for the both samples, we can conclude that a new class of compound seem to be responsible for at least a part of the mutagenic activity detected in drinking water generated from the Cristais River.

4. FINAL CONSIDERATIONS.

We speculate that the mutagenic activity detected by YG1041 in the Cristais River drinking water samples is related to non-colored compounds, derived from the chlorination of the azo dye components of the BDCP known to be present in raw water. We showed that the chlorinated by-products could be produced by the treatment and remain in the final drinking water. Future efforts should identify the structures of those new compounds, then a toxicological characterization could establish the risks involved in the consumption of the contaminated drinking water.

Acknowledgements

The authors thank Carlos Alberto Coimbra, Débora Arnsdorff Roubicek and Lourival Affonso Klupel Wanke for the collaboration helpful on this manuscript. This article does not necessarily reflect the views of CETESB nor the U.S. EPA and no official endorsement should be inferred. It has been subjected to review by the National Health and Environmental Effects Research Laboratory and approved for publication. Approval does not signify that the contents reflect the views of the Agency, nor does mention of trade names or commercial products constitute endorsement or recommendation for use.

Blue Component of BDCP (C.I. Disperse Blue 373)
Violet Component of BDCP (C.I. Disperse Violet 93)
Orange component of BDCP (C.I. Disperse Orange 37)

FIGURE 1. Structures of the components of the Black Dye Commercial Product (Blue, violet and orange) (source: Umbuzeiro et al., 2005).

FIGURE 2. Natural and acidic extraction procedures using Amberlite XAD4 resin

FIGURE 3. Chromatographic profile of Black dye commercial product (BDCP) (A); chlorinated solution (B) and a related drinking water sample (C).

FIGURE 4. Mutagenicity of the chlorinated BDCP solution extracted with XAD4 product using the strains TA98 and YG1041 in the presence and absence of S9, showing the increase of the effect when nitroreductase and O-acetyltransferase enzymes are overexpressed.

FIGURE 5. Thin Layer Chromatographic analysis of the raw (1), pre-chlorinated (2) and treated water extracts (3), compared with BDCP (4), showing the presence of the three dye components of the BDCP.

FIGURE 6. Mutagenic activity in revertants/l equivalent of raw, pre-chlorinated and drinking water extracts, for the strains YG1041 (A) and YG1042 (B), in the presence and absence of metabolic activation for the Cristais river and for the control site.

REFERENCES

- (1) Ashbolt, N. J. Risk analysis of drinking water microbial contamination versus disinfection by-products (DBPs). *Toxicology* 2004, 198, 255-262.
- (2) Paraskeva, P.; Graham, N. J. Ozonation of municipal wastewater effluents. *Water Environ Res* 2002, 74, 569-581.
- (3) Calderon, R. L. The epidemiology of chemical contaminants of drinking water. *Food Chem Toxicol* 2000, 38, S13-20.
- (4) Wigle, D. T. Safe drinking water: a public health challenge. *Chronic Dis Can* 1998, 19, 103-107.
- (5) Geldreich, E. E. Drinking water microbiology--new directions toward water quality enhancement. *Int J Food Microbiol* 1989, 9, 295-312.
- (6) Bove, F.; Shim, Y.; Zeitz, P. Drinking water contaminants and adverse pregnancy outcomes: a review. *Environ Health Perspect* 2002, 110 Suppl 1, 61-74.
- (7) Bull, R. J.; Birnbaum, L. S.; Cantor, K. P.; Rose, J. B.; Butterworth, B. E.; Pegram, R.; Tuomisto, J. Water chlorination: essential process or cancer hazard? *Fundam Appl Toxicol* 1995, 28, 155-166.
- (8) Glaze, W. H.; Andelman, J. B.; Bull, R. J.; Conolly, R. B.; Hertz, C. D.; Hood, R. D.; Pegram, R. A. Determining health risks associated with disinfectants and disinfection by-products: research needs. *J Am Water Works Assoc* 1993, 85, 53-56.
- (9) Sadiq, R.; Rodriguez, M. J. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: a review. *Sci Total Environ* 2004, 321, 21-46.
- (10) Kusamran, W. R.; Tanthasri, N.; Meesiripan, N.; Tepsuwan, A. Mutagenicity of the drinking water supply in Bangkok. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003, 4, 31-38.

- (11) Meier, J. R.; Knohl, R. B.; Coleman, W. E.; Ringhand, H. P.; Munch, J. W.; Kaylor, W. H.; Streicher, R. P.; Kopfler, F. C. Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions. *Mutat Res* 1987, 189, 363-373.
- (12) Woo, Y. T.; Lai, D.; McLain, J. L.; Manibusan, M. K.; Dellarco, V. Use of mechanism-based structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products. *Environ Health Perspect* 2002, 110 Suppl 1, 75-87.
- (13) Park, J. H.; Lee, B. J.; Lee, S. K.; Kim, K.; Lee, K. H.; Che, J. H.; Kang, K. S.; Lee, Y. S. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. *Mutat Res* 2000, 466, 173-178.
- (14) World Health Organization PLACE HOLDER -- NEED TITLE AND INFORMATION. 2004.
- (15) Houk, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res* 1992, 277, 91-138.
- (16) Ashby, J.; Lefevre, P. A.; Callander, R. D. The possible role of azoreduction in the bacterial mutagenicity of 4-dimethylaminoazobenzene (DAB) and 2 of its analogues (6BT and 5I). *Mutat Res* 1983, 116, 271-279.
- (17) Combes, R. D.; Haveland-Smith, R. B. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutat Res* 1982, 98, 101-248.
- (18) Esancy, J. F.; Freeman, H. S.; Claxton, L. D. The Effect of Alkoxy Substituents on the Mutagenicity of Some Aminoazobenzene Dyes and Their Reductive-Cleavage Products. *Mutation Research* 1990, 238, 1-22.

- (19) Umbuzeiro, G. d. A.; Freeman, H. S.; Warren, S. H.; Oliveira, D. P. d.; Sakagami, M.; Terao, Y.; Watanabe, T.; Claxton, L. D. Contribution of azo dyes to the mutagenic activity detected in the Cristais River waters. In *Chemosphere*, Submitted.
- (20) Umbuzeiro, G. d. A.; Freeman, H. S.; Warren, S. H.; Kummrow, F.; Claxton, L. D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. In *Food and Chemical Toxicology*, MIP.
- (21) Rafii, F.; Hall, J. D.; Cerniglia, C. E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food Chem Toxicol* 1997, 35, 897-901.
- (22) Nam, S.; Renganathan, V. Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH. *Chemosphere* 2000, 40, 351-357.
- (23) Nukaya, H.; Shiozawa, T.; Tada, A.; Terao, Y.; Ohe, T.; Watanabe, T.; Asanoma, M.; Sawanishi, H.; Katsuhara, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Identification of 2-[2-(acetylamino)-4-amino-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. *Mutat Res* 2001, 492, 73-80.
- (24) Shiozawa, T.; Tada, A.; Nukaya, H.; Watanabe, T.; Takahashi, Y.; Asanoma, M.; Ohe, T.; Sawanishi, H.; Katsuhara, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; Terao, Y. Isolation and identification of a new 2-phenylbenzotriazole-type mutagen (PBTA-3) in the Nikko river in Aichi, Japan. *Chem Res Toxicol* 2000, 13, 535-540.
- (25) Shiozawa, T.; Suyama, K.; Nakano, K.; Nukaya, H.; Sawanishi, H.; Oguri, A.; Wakabayashi, K.; Terao, Y. Mutagenic activity of 2-phenylbenzotriazole derivatives related to a mutagen, PBTA-1, in river water. *Mutat Res* 1999, 442, 105-111.
- (26) Watanabe, T.; Nukaya, H.; Terao, Y.; Takahashi, Y.; Tada, A.; Takamura, T.; Sawanishi, H.; Ohe, T.; Hirayama, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Synthesis of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in river water from Japan. *Mutat Res* 2001, 498, 107-115.

- (27) Watanabe, T.; Shiozawa, T.; Takahashi, Y.; Takahashi, T.; Terao, Y.; Nukaya, H.; Takamura, T.; Sawanishi, H.; Ohe, T.; Hirayama, T.; Wakabayashi, K. Mutagenicity of two 2-phenylbenzotriazole derivatives, 2-[2-(acetylamino)-4-(diethylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and 2-[2-(acetylamino)-4-(diallylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and their detection in river water in Japan. *Mutagenesis* 2002, 17, 293-299.
- (28) Watanabe, T.; Takahashi, Y.; Takahashi, T.; Nukaya, H.; Terao, Y.; Hirayama, T.; Wakabayashi, K. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. *Mutat Res* 2002, 519, 187-197.
- (29) Matsuoka, A.; Tada, A.; Terao, Y.; Nukaya, H.; Onfelt, A.; Wakabayashi, K. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (azo dyes) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. *Mutat Res* 2001, 493, 75-85.
- (30) Morisawa, T.; Mizuno, T.; Ohe, T.; Watanabe, T.; Hirayama, T.; Nukaya, H.; Shiozawa, T.; Terao, Y.; Sawanishi, H.; Wakabayashi, K. Levels and behavior of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens in the effluent of a sewage treatment plant. *Mutat Res* 2003, 534, 123-132.
- (31) Umbuzeiro, G. d. A.; Roubicek, D. A.; Rech, C. M.; Sato, M. I. Z.; Claxton, L. D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures. *Chemosphere* 2004, 54, 1589-1597.
- (32) BRASIL, Portaria 518, Ministério da Saúde, issued in 03/25/2004 and published in D.O.U. Executivo in 03/26/2004. 2004.
- (33) Moberg, L.; Karlberg, B. N,N'-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) method for the determination of free chlorine based on multiple wavelength detection. *Anal. Chem. Acta* 2000, 407, 127-133.

- (34) Kummrow, F.; Rech, C. M.; Coimbra, C. A.; Roubicek, D. A.; Umbuzeiro G, A. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. *Mutat Res* 2003, *541*, 103-113.
- (35) Pellizari, E. D.; Sheldon, L. S.; Bursey, J. T.; Michael, L. C.; Zweidinger, R. A. "Master Analytical Scheme for Organic Compounds in Water, Chapter 9,," U.S.EPA, 1984.
- (36) Kado, N. Y.; Langley, D.; Eisenstadt, E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat Res* 1983, *121*, 25-32.
- (37) Meier, J. R. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat Res* 1988, *196*, 211-245.
- (38) Schenck, K. M.; Wymer, L. J.; Lykins, B. W., Jr.; Clark, R. M. Application of a Finnish mutagenicity model to drinking waters in the U.S. *Chemosphere* 1998, *37*, 451-464.
- (39) Bernstein, L.; Kaldor, J.; McCann, J.; Pike, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutat Res* 1982, *97*, 267-281.
- (40) Weber, E. J.; Adams, R. L. Chemical- and sediment-mediated reduction of the azo dye disperse blue 79. *Environ Sci Technol* 1995, *29*, 1163-1170.
- (41) Ringhand, H. P.; Meier, J. R.; Kopler, F. C.; Schenk, K. M.; Taylor, W. H.; Mitchell, D. E. Importance of sample pH on recovery of mutagenicity from drinking water by XAD resins. *Environ Sci Technol* 1987, *21*, 382-387.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação a caracterização química realizada em amostras de efluente bruto e tratado da indústria de tingimento localizada na área do Ribeirão dos Cristais foi possível verificar que:

- Tanto o efluente bruto como tratado apresentaram os componentes do produto comercial preto (BDCP): C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Orange 37 e C.I. Disperse Violet 93, entre outros corantes. Aminas aromáticas mutagênicas, dentre elas produtos de clivagem dos corantes acima mencionados bem como algumas proibidas pela Comunidade Européia foram preliminarmente identificadas. Também foram detectados compostos fluorescentes de estrutura química desconhecida.
- O tratamento biológico utilizando lodos ativados aplicado pela indústria não foi eficiente na remoção dos corantes, das aminas aromáticas e dos compostos fluorescentes avaliados neste estudo.
- A técnica de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) otimizada neste estudo se mostrou altamente sensível, pois foi possível observar visualmente quantidades de 0.001 ug do produto comercial preto (BDCP) nas condições cromatográficas. Devido a sua simplicidade e baixo custo, esta técnica é adequada para o monitoramento da presença de corantes em amostras ambientais.

Em relação à avaliação da presença de corantes e mutagenicidade das amostras de sedimento do Ribeirão dos Cristais foi possível verificar que:

- As amostras de sedimento após o lançamento do efluente industrial, inclusive a 6 km do lançamento (ETA) apresentaram atividade mutagênica mais elevada que o ponto controle e dois dos componentes do produto comercial preto (BDCP): C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Orange 37 foram detectados. Os compostos fluorescentes de estrutura química desconhecida foram também detectados nas mesmas amostras.
- A ausência do corante C.I. Disperse Violet 93 nas amostras de sedimento pode indicar que ele seja mais rapidamente degradado no sedimento ou tenha menor capacidade de adsorção a essa matriz.

- O lançamento de efluentes líquidos da indústria de tingimento se mostrou responsável pela contaminação observada no sedimento em relação à presença de corantes mutagênicos.
- Considerando as potências mutagênicas dos corantes azul e laranja, observando os níveis em que os mesmos foram detectados e comparando com a potência das amostras de sedimento analisadas, sugere-se que esse efeito seja devido à presença dos corantes detectados.
- Não foram detectados corantes nos organismos bentônicos coletados nos pontos após o lançamento industrial nas condições experimentais.

Em relação à verificação da formação de compostos mutagênicos incolores a partir da cloração do corante comercial preto (BDGP) foi possível verificar que:

- Durante a cloração do BDGP em condições similares às aquelas realizadas pela Estação de Tratamento de Água são formados compostos genotóxicos incolores com perfil cromatográfico e mutagênico similares àqueles encontrados na água tratada proveniente do Ribeirão dos Cristais.
- Especula-se que esses compostos possam ser responsáveis pela atividade mutagênica relacionada a nitro compostos policíclicos, reportada anteriormente em amostras de água tratada do Ribeirão dos Cristais.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que corantes azóicos são uma importante classe de contaminantes ambientais que deveriam ser melhor avaliados toxicologicamente, especialmente quanto à sua atividade genotóxica e carcinogênica, tendo em vista o risco direto e indireto de exposição humana a esses compostos ou produtos relacionados.

RECOMENDAÇÕES

É necessário o desenvolvimento de tecnologias de tratamento de efluentes contendo corantes azóicos visando a sua completa degradação (mineralização). Sugere-se que a

eficiência dessas técnicas deva ser avaliada utilizando-se a combinação das análises químicas e dos ensaios toxicológicos aplicados neste estudo.

Em estações de tratamento de esgotos que recebem efluentes de indústrias de tingimento contendo corantes não é recomendada a utilização de cloro nas etapas de desinfecção, pois esse processo, apesar de eliminar a cor dos corantes, pode levar à formação de compostos clorados mutagênicos ainda mais potentes que os corantes originais.

Medidas de Produção Mais Limpa (P+L), de Prevenção à Poluição (P₂) e otimização de reuso de água devem ser implantadas pela indústria para reduzir a emissão de corantes.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ANLIKER, R. Ecotoxicology of dyestuffs – a join effort by industry. **Ecotox. Environ. Safe.** v. 3, p. 59-74, 1979.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20 th ed. **American Public Health Association**, Washington, DC, 1998.

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

ASPLAND, J.R. Textile Dyeing and Coloration. American Association of Textile Chemistis and Colorists, RTP, NC, 1997.

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

BERCHTOLD, T.; TURCANU, A.; GANGLBERGER, E.; GEISLER, S.J. J. Natural dyes in modern textile dyehouses – how to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future. **J.Cleaner Produc.**, v.11, p. 499-509, 2003.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.97, p.267-281, 1982.

BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986, Classifica as águas do Território Nacional, **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de junho de 1986.

BRASIL, Portaria nº 518, Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26/ de Março de 2004.

CARNEIRO, P.A.; OSUGI, M.E.; SENE, J.J.; ANDERSON, M. A.; ZANONI, M.V.B. Evaluation of color removal and degradation of a reactive textile azo dye on nanoporous TiO₂ thin-film electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 3807-3820, 2004.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Determinação de bentos de Água Doce – Macroinvertebrados. Método Qualitativo e Quantitativo**. São Paulo, CETESB, Norma Técnica L5.309, 14p. 2003a.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo**. São Paulo, Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/agua/agua.geral.htm/relatorio. Acesso em: Janeiro de 2003b.

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

CHUNG, K.T. The reduction of azo dyes by intestinal microflora. **Critical Rev. Microbiol.**, v. 18, p. 175-190, 1992.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E. The reduction of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

CLONFERO, E.; VERNIER, P.; GRANELL, M.; LEVIS, A.G. Leather azo dyes: mutagenic and carcinogenic risks. **Med. Lav.**, Milão, v. 81, p.222-229, 1990.

DeMARINI, D.; BROOKS, L.R.; BHATNAGAR, V.K.; HAYES, R.B.; EISCHEN, B.T.; SHELTON, M.L.; ZENSER, TALASKA, G.; KASHYAP, S.K.; DOSEMECI, M.;

KASHYAP, R.; PARIKH, D.J.; LAKSHMI, V.; DAVIS, B.B.; JAEGER, M.; ROTHMAN, N. Urinary mutagenicity as a biomarker in workers exposed to benzidine: correlation with urinary metabolites and urothelial DNA adducts. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 981-988, 1997.

DRESSLER, M. Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.165, p.167-206, 1979.

DUTKA, B.J.; JOVA, A.; BRECHIN, J. Evaluation of four concentration/ extraction procedures on water and effluents collected for use with *Salmonella typhimurium* screening procedures for mutagens. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 27, p. 758-169, 1981.

ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY, Kroschwitz, J.I.; Howe-Grant, M (eds.) 4 ed. , John Wiley & Sons: New York,1993.

ETAD . Lion, www.etad.com/information_6html, acesso em: dezembro de 2002.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environ. Inter.**, v. 30, p. 953-971, 2004.

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

GALASSI, S.; GUZELLA, L.; MINGAZZINI, M.; VIGANO, L.; CAPRI, S.; SORA, S. Toxicological and chemical characterization of organic micropollutants in river PO waters (Italy). **Water Res.**, v. 26, p. 19-27, 1992.

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

GOLD, M.H.; JEFFREY, K.G.; ALIC, M. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. **Meth. Enzimol.**, v. 161, p. 74-78, 1988.

GREGORY, P. Classification of dyes by chemical structures. In: WARING, D., HALLAS, G. (eds) *The Chemistry and Application of Dyes*: 1990, Plenum Press, New York.

GRIFFOL, M.; SOLANAS, A.M.; BAYONA, J.M. Bioassay-directed chemical characteristics of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of Besos and Llobregat rivers. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, Oxford, v. 23, p. 19-25, 1992.

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

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

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

HAYATSU, H. Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulphonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 597, p. 37-56, 1992.

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

IARC – International Institute for Research on Cancer – Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some aromatic azo compounds, v. 8, Lyon , France, pp. 1-357, 1975.

JOACHIM, F.; BURRELL, A.; ANDERSEN, J. Mutagenicity of azo dyes in the Salmonella/ microsome assay using in vitro and in vivo activation. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 156, p. 131-138, 1985.

JUNK, G.A.; RICHARD, J.J.; GRIESER, M.D.; WITIAK, D.; WITIAK, J.L.; ARGUELLO, M.D.; VICK, R.; SVEC, H.J.; FRITZJ.S.; CALDER, G.V. Use of macroreticular resin in the analysis of water for trace organic contaminants. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.99, p.745-762, 1974.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.121, p.25-32, 1983.

KATAOKA, H.; HAYATSU, T.; HIETSH, G.; STEINKELLNER, H.; NISHIOKA, S.; NARIMATSU, S., HAYATSU, H. Identification of heterocyclic amines in the water of Danube river. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 466, p. 27-35, 2000.

KIRBY, N.; MARCHANT, R. ; McMULLAN, G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 188, p. 93-96, 2000.

KIRBY, N.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolourisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotech. Lett.**, v.17, p.761-764, 1985.

KRANENDONK, M.; LAIRES, A.; RUEFF, J.; ESTABROOK, R.W.; VERMEULEN, N.P.E. Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in

mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 30, p. 287-306, 2000.

KUMMROW, F.; RECH, C.M.; COIMBRÃO, C.A; ROUBICEK, ARNSDORFF,D.; UMBUZEIRO, G.A. Comparision of the mutagenic activity of XAD4 and the blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 541, p.103-113, 2003.

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

KUSAMRAN, W. R.; TANTHASRI, N.; MEESIRIPAN, N.; TEPSUWAN, A. Mutagenicity of the drinking water supply in Bangkok. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 4, p.31-38, 2003.

MAILLING, H.V. Dimethylnitrosoamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 12, p. 425-429, 1971.

MARON, D.N.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.113, p.173-215, 1983.

MARTIN, C.N.; KENNELLY, J.C. Rat liver microsome azoreductase activity on four azo dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethoxybenzidine. **Carcinogenesis**, v. 2, p. 307-312, 1981.

MATSUOKA, A.; TADA,A.; TERAQ, Y.; NUKAYA, H.; ONFELT, A.; WAKABAYASHI, K. Chromossomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their mother compounds (AZO DYES) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 493, p. 75-85, 2001.

MEIER, J. R. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 196, p. 211-245, 1988.

MEIER, J.R.; LINGG, R.D.; BULL, R.J. Formation of mutagens following chlorination of humic acid. A model for mutagen formation during drinking water treatment. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 118, p. 25-41, 1983.

MEIER, J.R.; KNOHL, R.B.; COLEMAN, W.E.; RINGHAND, H.P.; MUNCH, J.W.; KAYLOR, W.H.; STREICHER, R.P.; KOPFLER, F.C. Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5hydroxy-2(5H)-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and chlorinated humic acid solutions. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 189, p. 363-373, 1987.

MICHAEL, G.; LEWIS, D. Sorption and toxicity of azo triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v. 4, p. 45-50, 1985.

MOBERG, L.; KARLBERG, B. N,N'-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) method for the determination of free chlorine based on multiple wavelength detection. **Anal. Chem. Acta**, v.407, p.127-133, 2000.

MONARCA, S.; PASQUINI, R.; SFOZOLINI, G.S. Mutagenicity assessment of different drinking water supplies before and after treatments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 34, p. 815-823, 1985.

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

NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biochem.**, v. 31, p. 435-442, 1996.

NIH – National Institute of Health. <http://ehp.niehs.nih.gov/roc/toc10.html>. Acesso em dezembro de 2002.

NONY, C.R.; BOWMAN, M.C.; CAIRNS, T.; LOWRY, L.K., TOLOS, W.P. Metabolism studies of an azo dye and pigment in the hamster based on analysis of the urine for potentially carcinogenic aromatic amines. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 4, p. 132-140, 1980.

PATTERSON, R.M.; BUTLER, J.S. Tartarazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 20, p. 461-465, 1982.

PELLIZARI, E. D.; SHELDON, L. S.; BURSEY, J. T.; MICHAEL, L. C.; ZWEIDINGER, R. A. "Master Analytical Scheme for Organic Compounds in Water, Chapter 9," **U.S.EPA**, 1984.

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

PORWOLLIK, S.; WONG, R.M.Y.; SIMS, S.H.; SCHAAPER, R.M.; DeMARINI, D.M.; MCCLELLAND, M. The *ΔuvrB* mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 483, p.1-11, 2001.

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

REHANA, Z.; MALIK, A.; AHMAD, M. Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P.), India. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 343, p. 137-144, 1995.

RINGHAND, H.P.; MEIER, J.R.; KOPLER, F.C.; SCHENCK, K.M.; TAYLOR, W.H.; MITHCHELL, D.E. Importance of sample pH on recovery of mutagenicity from drinking water by XAD resins. **Environ. Sci. Technol.**, v. 21, p. 382-387, 1987.

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

SABESP. www.sabesp.com.br/o_que_fazemos/captacao_distribuicao_de_agua.htm. São Paul, acesso em: dezembro de 2004.

SCHENCK, K.M.; WYMER, L.J.; LYKINS, Jr.B.W.; CLARK, R.M. Application of a Finnish mutagenicity model to drinking waters in the U.S. **Chemosphere**, Oxford, v. 37, p. 451-464, 1988.

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

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

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY **Best Management Practices for Pollution Prevention in the Textile Industry**. Office of Research and Development. EPA/625/R-96/004, 1996.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Aerobic and anaerobic treatment of C.I. Disperse blue 79**. US Department of Commerce,

National Technical Information Service (NTIS) (1989) vol. I and II, EPA/600/2-89/051 (PB 90-111642), 1989.

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

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

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I. 2001. The Salmonella mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. **Mutat Res**, Amsterdam, v.491, p.119-126, 2001.

VALENT, G.U.; SATO, M.I.Z.; COELHO, M.C.L.S.; COIMBRAO, C.A.; SANCHEZ, P.S.; MARTINS, M.T.; BONATELLI, Jr R. Monitoring of Sao Paulo State rivers in Brazil for mutagenic activity using Ames test. **Water Quality**, v. 8, p. 371-381, 1993.

VARTIAINEN, T.; LIIMATAINEN, A. High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 169, p. 29-34, 1986.

VENTURINI, S.; TAMARO, M. Mutagenicity of anthraquinone and azo dyes in Ames *Salmonella typhimurium* test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 68, p. 307-312, 1979.

VOLKER, M.; ARLT, V.M.; HEWER, A.; SORG, B. L.; SCHMEISER, H.; PHILLIPS, D.H.; STIBOROVA, M. 3-Aminobenzanthrone, a Human Metabolite of the Environmental Pollutant 3-Nitrobenzanthrone, Forms DNA Adducts after Metabolic Activation by Human

and Rat Liver Microsomes: Evidence for Activation by Cytochrome P450 1A1 and P450 1A2. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 17, p. 1092-1101, 2004.

WATANABE, T.; TAKAHASHI, Y.; TAKAHASHI, T.; NUKAYA, H.; TEARO, Y.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 519, p.187-197, 2002.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 10, p. 1009-1017, 1998.

ZHOU, Q.; TALASKA, G.; JAEGER, M.; BHATNAGAR, V.K.; HAYERS, R.B.; ZENZER, T.V.; KASHYAP, S.K.; LAKSHMI, V.M.; KASHYAP, R.; DOSEMECI, M.; HSU, F.F.; PARIKH, D.J.; DAVIS, B.; ROTHMAN, N. Benzdine-DNA adduct levels in human peripheral white blood cells significantly correlate with levels in exfoliated urothelial cells. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 393, p. 199-205, 1997.

7. ANEXO

8. CURRÍCULO

Curriculum Vitae - CNPq

Abril/2005

Dados Pessoais

Nome Danielle Palma de Oliveira
 Nome em OLIVEIRA, D. P.
 citações
 bibliográficas
 Sexo feminino

Filiação Claiton Batista de Oliveira e Edna Suzana Palma de Oliveira
 Nascimento 28/01/1977 - Pouso Alegre/MG - Brasil
 Carteira de 262395034 SSP-SP - SP - 19/06/1990
 Identidade
 CPF 03223856609
 Endereço RUA PASCOAL VITA, 405 AP.81
 residencial VILA BEATRIZ - Sao Paulo
 05445000, SP - Brasil
 Telefone: 11 38121475
 E-mail: dpog@hotmail.com

Endereço Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal
 profissional R. Gabriel Monteiro da Silva, 714, sala D202
 Centro - Alfenas
 37130-000, MG - Brasil
 Telefone: 35 32991224
 E-mail: dpalma@usp.br
 URL da home page: <http://www.efoa.br>

Formação Acadêmica/Titulação

2002 - 2005 Doutorado em Toxicologia.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Corantes como importante classe de contaminantes ambientais - um estudo de caso, Ano de obtenção: 2005
 Orientador: Dra. Gisela de aração Umbuzeiro
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Palavras-chave: ambiental, azo corantes, cromatografia em camada delgada, mutagenicidade, água tratada

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ambiental

1999 - 2002 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Valores de Referência para acetona urinária em humanos, Ano de obtenção: 2002
 Orientador: Profa Dr. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

1995 - 1999 Graduação em Farmácia Bioquímica.
 Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil

Formação complementar

1995 - 1995 Curso de curta duração em AIDS - aspectos clínicos e sociais.
 Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil
 1995 - 1995 Curso de curta duração em Hepatite e suas implicações.
 Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil
 1995 - 1995 Curso de curta duração em Histologia dos Sistemas.
 Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil
 1996 - 1996 Curso de curta duração em Windows 3.1 e Word 6.0.
 Acrópole - cursos e treinamento, ACRÓPOLE, Brasil
 1996 - 1996 Curso de curta duração em Princípios Fundamentais sobre estereoquímica.
 Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil

- 1997 - 1997 Curso de curta duração em Administração de Medicamentos injetáveis.
Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil
- 1997 - 1997 Curso de curta duração em Farmácia Clínica.
Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, Brasil
- 1997 - 1997 Curso de curta duração em Biodisponibilidade de med ação prolongada.
Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, Brasil
- 1997 - 1997 Curso de curta duração em Fitocosmecêutica.
Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil
- 1998 - 1998 Curso de curta duração em Alternativas Produtos Manipulados Farmácia Magistr.
Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil
- 1998 - 1998 Curso de curta duração em Montagem de farmácia magistral.
Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal, EFOA/CEUFE, Alfenas, Brasil
- 2000 - 2000 Curso de curta duração em Cromatógrafo CG-1000 e Sistema de Integração IQ.
CG - Ciola & Gregori Ltda, CG, Brasil
- 2000 - 2000 Curso de curta duração em Introdução a cromatografia a Gás.
CG - Ciola & Gregori Ltda, CG, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Prevenindo e tratando as farmaco-dependências.
Federação de Sociedades de Biologia Experimental, FESBE, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Filtração para laboratório químico microbiológico.
Millipore, MILLIPORE, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Purificação de água para laboratório.
Millipore, MILLIPORE, Brasil
- 2003 - 2003 Curso de curta duração em Espectrometria de Absorção atômica - SIMAA 6000.
PerkinElmer do Brasil, PERKINELMER, Brasil
- 2003 - 2003 Curso de curta duração em Áreas contaminadas e saúde.
Direção Regional de Saúde - DIR XIX, DRS-XIX, Brasil
- 2004 - 2004 Curso de curta duração em Saúde da Criança e Qualidade Ambiental.
Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SMA, Brasil
- 2004 - 2004 Curso de curta duração em GC/MS e HPLC/MS.
Agilent Technologies, AGILENT, Brasil

Atuação Profissional

1. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental - CETESB

Vínculo institucional

2003 - 2005 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 30, Regime : Parcial
Outras informações:
Estágio desenvolvido em convênio com a Universidade de São Paulo para a realização da parte laboratorial do doutorado.

Atividades

04/2003 - Atual **Pesquisa e Desenvolvimento**, Divisão de Toxicologia, Genotoxidade e Microbiologia Ambiental

Linhas de Pesquisa

1. Pesquisa de corantes genotóxicos em amostras ambientais
2. Avaliação da exposição humana a chumbo através da determinação do metal em sangue por espectrometria de absorção atômica

2. Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Centro Universitário Federal - EFOA/CEUFE

Vínculo institucional

1999 - 2003 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: professor substituto , Carga horária: 40, Regime : Integral

2005 - Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: professora substituta de Toxicologia , Carga horária: 40, Regime : Dedicação Exclusiva

Atividades

1/1999 - 1/2003 **Graduação**

1. Toxicologia e Análises Toxicológicas

3. Universidade Vale do Rio Doce - UNICOR

Vínculo institucional

2001 - 2003

Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professora de Toxicologia , Carga horária: 6, Regime : Parcial

Atividades

03/2001 - 12/2003

Graduação

1. Toxicologia e análises toxicológicas

Áreas de atuação

1	Toxicologia Ocupacional
2	Toxicologia Ambiental

Idiomas

Entende	Inglês (Bem) , Espanhol (Razoável)
Fala	Inglês (Bem) , Espanhol (Pouco)
Lê	Inglês (Bem) , Espanhol (Razoavelmente)
Escreve	Inglês (Bem) , Espanhol (Pouco)

Trabalhos completos publicados em anais de evento

1.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B., SANTOS, C. D.

Protoporfirina IX Total eritrocitária: Valores de referência In: XI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 1999, Guarujá - SP.

Revista Brasileira de Toxicologia. , 1999. v.12. p.135 - 135

Palavras-chave: valores de referência, protoporfirina

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2.

OLIVEIRA, D. P., OLIVEIRA, C. D. S., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Valores de referência para o ácido delta aminolevulínico urinário e protoporfirina IX total eritrocitária total In: IV jornada de iniciação científica de Alfenas, 1998, Alfenas.

IV Jornada de Iniciação Científica de Alfenas. , 1998.

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

1.

OLIVEIRA, D. P., UMBUZEIRO, G. A.

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E DA PRESENÇA DE CORANTES NO EFLUENTE INDUSTRIAL TRATADO LANÇADO POR UMA INDÚSTRIA DE TINGIMENTO In: XIX Seminário de Pós-Graduação, 2004, São Paulo-SP.

Revista Brasileira de Análises Clínicas. , 2004.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2.

OLIVEIRA, D. P., UMBUZEIRO, G. A.

Avaliação da mutagenicidade e da presença de corantes no efluente industrial tratado lançado por uma indústria de tingimento In: SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP, 2004, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2004.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

3.

OLIVEIRA, D. P.

Deteção de corantes e avaliação da mutagenicidade do sedimento do Ribeirão dos Cristais. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2004, Florianópolis - SC.

Anais do VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. , 2004. p.41 - 41

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4.

OLIVEIRA, D. P., KUMMROW, F., UMBUZEIRO, G. A., DELLA ROSA, H. V.

A cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) como ferramenta de triagem para detecção de compostos genotóxicos ambientais In: XIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2003, Londrina.

Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: Revista Brasileira de Toxicologia, 2003. v.16. p.070 - 070

Palavras-chave: ambiental, cromatografia em camada delgada

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ambiental

Setores de atividade : Cuidado à saúde das pessoas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

5.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Acetona em urina: valores de referência In: XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2002, Salvador.

XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 2002.

Palavras-chave: acetona, valores de referência

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

6.

LEITE, Edna Maria Alves, SILVEIRA, Joseane Nicácio, OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Ácido trans, trans mucônico em urina: valores de referência. In: 54a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2002, Goiânia.

54a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. , 2002.

Palavras-chave: benzeno, valores de referência, trans, trans mucônico

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

7.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Valores de referência para actona urinária em população do sul de Minas Gerais In: VII Semana de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2002, São Paulo.

Revista Brasileira de Toxicologia. , 2002.

Palavras-chave: acetona, valores de referência

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

POSSÍVEIS EFEITOS DO SEXO, IDADE, HÁBITOS DE BEBER E DE FUMAR SOBRE OS NÍVEIS DE ACETONA EM URINÁRIA NUMA POPULAÇÃO GERAL. In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2001, Caxambu-MG.

Anais da XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 2001.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

9.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Valores basais de acetona urinária em uma população não exposta ocupacionalmente: valores de referência In: XII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2001, Porto Alegre - RS.

Revista Brasileira de Toxicologia. , 2001. v.14. p.36 - 36

Palavras-chave: valores de referência, acetona, urina

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

10.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Headspace para acetona urinária In: XI Congresso Latino Americano de toxicologia- ALATOX 2000, 2000, Campinas.

Revista Brasileira de Toxicologia. , 2000. v.13. p.84 -

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

11.

OLIVEIRA, D. P.

PROTOPORFIRINA IX TOTAL EM ERITRÓCITOS : VALORES DE REFERÊNCIA In: I Congresso Científico da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, 1999, Alfenas-MG.

Anais do I Congresso Científico da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas. , 1999. p.46 - 46

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

12.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B., SANTOS, C. D.

Reference values for d-aminolevulinic acid in urine in a population of south Minas Gerais, Brasil In: III Simposio de la Sección de America Latina y el Caribe da la AOAC international, 1999

Anais do III Simposio de la Sección de America Latina y el Caribe de la AOAC international. , 1999. p.38 - 38

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Chile/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

13.

OLIVEIRA, D. P., OLIVEIRA, C. D. S., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Valores de referência para o ácido delta aminolevulínico urinário e protoporfirina IX eritrocitária Total In: XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia experimental, 1998, Caxambu.

XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 1998.

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

14.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B., OLIVEIRA, C. D. S.

Valores de referência para o ácido delta aminolevulínico urinário e protoporfirina IX eritrocitária total In: III Jornada de iniciação científica de Alfenas, 1997, Alfenas.

III Jornada de iniciação científica de Alfenas. , 1997.

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Artigos completos publicados em periódicos

1.

OLIVEIRA, D. P., KUHLMANN, M. L., UMBUZEIRO, G. A.

Evaluation of the presence of mutagenic dyes in sediments from Cristais River. Soil & Sediment Contamination. , 2005.

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
submetido

2.

UMBUZEIRO, G. A., FREEMAN, H. S., WARREN, S. H., OLIVEIRA, D. P., TERAQ, Y., WATANABE, T., CLAXTON, L. D.

The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. Chemosphere. , 2005.

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

in press

3.

UMBUZEIRO, G. A., OLIVEIRA, D. P., COIMBRAO, C. A., ROUBICEK, D. A., STRAUS, E. L.

Mutagenic activity of sludge samples generated in dyeing processing textile plants. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: , v.17, n.2, 2004.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

4.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Reference values of urinary acetone in a Brazilian population and influence of gender, age, smoking and drinking. La Medicina del Lavoro. Milano: , v.95, n.1, p.32 - 38, 2004.

Palavras-chave: reference values, acetone, urine

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Setores de atividade : Cuidado à saúde das pessoas

Referências adicionais : Itália/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5.

SIQUEIRA, M. E. P. B., PESSOA, P. P. M., OLIVEIRA, D. P., LUENGO, Denise de Moura Leite

Delta-Aminolevulinic acid dehydratase activity in the general population of south Minas Gerais, Brazil.. Industrial Health. , v.41, n.1, p.19 - 23, 2003.

Palavras-chave: reference values, lead, delta-aminolevulinic acid dehydratase

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Inglaterra/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6.

OLIVEIRA, D. P., LEITE, Edna Maria Alves, MIRANDA, G. M., SILVEIRA, Joseane Nicácio, SILVA, J. B. B.

Determination of cadmium in human urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta. , v.491, p.231 - 237, 2003.

Palavras-chave: cadmium, electrothermal atomic spectrometry, human urine

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Setores de atividade : Cuidado à saúde das pessoas

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

7.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B.

Valores de referência de bioindicadores: uma visão geral.. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: , v.16, n.1, p.49 - 53, 2003.

Palavras-chave: valores de referência

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Setores de atividade : Cuidado à saúde das pessoas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B., SANTOS, C. D.

Protoporfirina IX eritrocitária: valores de referência na população do sul de Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Análises Clínicas. , v.32, n.3, 2000.

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

9.

OLIVEIRA, D. P., SIQUEIRA, M. E. P. B., SANTOS, C. D.

Valores de referência do ácido d-aminolevulinico na urina de população da região sul de Minas Gerais, não ocupacionalmente exposta ao chumbo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , v.36, n.2, p.227 - 232, 2000.

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ocupacional

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Participação em eventos

1.

OLIVEIRA, D. P.

VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2004. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2.

OLIVEIRA, D. P.

Conferência proferida, 2003. (Congresso, Participações em eventos)

Áreas do conhecimento : Toxicologia Ambiental

Referências adicionais : Brasil/Português.

3.

OLIVEIRA, D. P.

XIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2003. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português.

4.

OLIVEIRA, D. P.

XII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2001. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

5.

OLIVEIRA, D. P.

XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2001. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

6.

OLIVEIRA, D. P.

54a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2001. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

7.

OLIVEIRA, D. P.

XI Congresso Latino Americano de Toxicologia – ALATOX 2000, 2000. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8.

OLIVEIRA, D. P.

XI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 1999. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

9.

OLIVEIRA, D. P.

II Conferência Municipal de Saúde, 1998. (Encontro, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

10.

OLIVEIRA, D. P., OLIVEIRA, C. D. S., SIQUEIRA, M. E. P. B.

IV JICA - Jornada de Iniciação Científica de Alfenas, 1998. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

11.
OLIVEIRA, D. P.
III JICA - Jornada de Iniciação Científica de Alfenas, 1997. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português.

12.
OLIVEIRA, D. P.
X Congresso Brasileiro de Toxicologia, 1997. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

13.
OLIVEIRA, D. P.
XXXIII Jornada Científica de Alfenas, 1997. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

14.
OLIVEIRA, D. P.
XXXII Jornada Científica de Alfenas, 1996. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

15.
OLIVEIRA, D. P.
XXXI Jornada Científica de Alfenas, 1995. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

16.
OLIVEIRA, D. P.
4a Semana Farmacêutica da Unifenas, 1995. (Congresso, Participações em eventos)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Indicadores de produção

Informações complementares

Participações em eventos	16
--------------------------	----

Produção bibliográfica

Artigos publicados em periódicos	9
----------------------------------	---

Completos	9
-----------	---

Trabalhos publicados em anais de eventos	16
--	----

Completos	2
-----------	---

Resumos	14
---------	----