UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Investigação de lesões em DNA induzidas por produtos de
redução do corante C.I. Disperse Blue 291

Paula Carpes Victório Carmazen

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo
2007

Paula Carpes Victório Carmazen

Investigação de lesões em DNA induzidas por produtos de
redução do corante C.I. Disperse Blue 291

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo
2007

Paula Carpes Victório Carmazen

Investigação de lesões em DNA induzidas por produtos de
redução do corante C.I. Disperse Blue 291

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro
orientador/presidente

Tania Marcourakis
1º examinador

Janice Onuki
2º examinador

São Paulo, 3 de Outubro de 2007.

*“O sábio teme o céu sereno; em compensação,
quando vem a tempestade ele caminha sobre
as ondas e desafia o vento.”*

Confúcio

Dedico este trabalho

*Ao meu marido Júlio Cesar pelo amor e
companheirismo; sobretudo nas horas difíceis.*

Aos meus pais Marcia e Paulo que sempre me ensinaram a ter caráter, perseverança e nunca esmorecer frente a uma adversidade.

Aos meus irmãos José Paulo e Soraya. Vocês são exemplos que eu sempre seguirei.

À minha avó Nilce pelo seu amor e por suas orações que sempre me guiaram.

*À Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro pela
orientação.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Professora Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau por seu apoio, seus ensinamentos e sua inestimável amizade.

Ao eterno mestre Professor Dário Bonifácio por ter me apresentado à Toxicologia e por sua amizade.

Ao meu primo Thiago Francisco Costa Carpes Borges, um excelente Químico, que me prestou grandes auxílios durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Tania Marcourakis e Professora Dra. Janice Onuki pela atenciosa correção desta dissertação e pela gentileza dedicada.

À professora Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro e Professor Dr. Ernani Pinto pelas preciosas contribuições que me concederam durante o exame de qualificação.

À professora Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros e Professor Dr. Paolo Di Mascio por terem cedido seus laboratórios para desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ivan Persio de Arruda Campos pelo auxílio nas análises espectroscópicas.

Ao Osmar Francisco Gomes que sempre me auxiliou tecnicamente com assuntos diversos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Ângelo Balestrin, Carmem Lúcia G. Antunes, Dalva C. Moura, Elaine Midori Ychico, Helena Maria de S. Francisco, Jorge Alves de Lima, Luzia Valderrama, Maria

Roseli Ramos e Karla Maria de Souza (SBTOX) pelo apoio técnico e ótimas conversas.

À Inês Gonçalves por ter processado as inúmeras análises submetidas à Ressonância Magnética Nuclear e por sua atenção para comigo.

À Leila Aparecida Bonádio por ter corrigido as referências bibliográficas.

Às colegas da Pós-Graduação Daniela Mendes Louzada de Paula, Paula da Silva Kuybida e Vânia Cristina Rodríguez Salazar e amigos do laboratório (Igo Dutra, Julita Maria Pereira Borges e Sílvia Araújo da Silva Hermida pela amizade, apoio e conversas animadoras.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

E a todos que estiveram presentes participando de alguma forma durante esses anos.

Muito obrigada!

Sumário

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Compostos Azo, Nitro e Amino aromáticos: Potencial tóxico	01
1.2 Adutos de DNA: Mecanismos de formação envolvendo arilaminas	10
1.3 Técnicas para detecção de adutos de DNA.....	15
1.4 Corantes azo como contribuintes para a atividade mutagênica de água potável	19
1.5 C.I. Disperse Blue 291 (DB 291)	28
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Equipamentos	34
3.2 Reagentes	36
3.3 Redução do corante C.I. Disperse Blue 291 com sulfito de sódio (Na_2S_2).....	36
3.4 Redução do corante C.I. Disperse Blue 291 com ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).....	37
3.5 Análise dos produtos de redução do corante C.I. Disperse Blue 291 por HPLC/PDA	37
3.6 Análise dos produtos de redução do corante C.I. Disperse Blue 291 por HPLC/UV/ESI/MS.....	37
3.7 Análise do corante C.I. Disperse Blue 291 e seus produtos de redução por ^1H RMN.....	38
3.8 Acetilação dos produtos reduzidos coletados e incubação com 2'-desoxiguanosina	38
3.9 Determinação da absorvidade molar dos quatro produtos reduzidos coletados.....	38
3.10 Cloração do pico 2 com hipoclorito de sódio	39
3.11 Redução do corante C.I. Disperse Blue 291 com nitrorredutase	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5. CONCLUSÕES	72
6. BIBLIOGRAFIAS	74

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estruturas dos compostos nitro e azo representantes	03
Figura 2. Esquema reacional ilustrando 1) nitro-redução e 2) azo-redução	05
Figura 3. Corantes azo que não produzem atividade mutagênica após ação de azo-redutases	06
Figura 4. Esquema de biotransformação do Sudan I	08
Figura 5. Bioativação de aminas aromáticas. A) Arilamina, B) <i>N</i> -hidroxilamina, C) <i>N</i> -acetoxi., D) Ion nitrênio	09
Figura 6. Esquema geral para carcinogênese química envolvendo via genotóxica	10
Figura 7. Mecanismo proposto para formação de adutos de aminas aromáticas a partir do ataque na posição N7	12
Figura 8. Formação de adutos de DNA a partir de compostos nitro/aminoaromáticos	13
Figura 9. Sítios das bases do DNA com potencial para reações com eletrófilos (A) (B). Principais adutos de DNA formados a partir de 4-aminobifenil (C) e benzidina (D)	14
Figura 10. Via proposta para síntese dos PBTAs não clorados e PBTAs ...	23
Figura 11. Estruturas químicas dos corantes que compõem o composto preto comercial	26
Figura 12. Estrutura química do corante azo C.I. Disperse Blue 291	28
Figura 13. Cromatogramas obtidos por HPLC/PDA	41
Figura 14. Cromatograma obtido por HPLC/UV ($\lambda = 240$ nm) dos produtos resultantes da reação do corante CI Disperse Blue 291 com ditionito de sódio e seus respectivos espectros de absorbância	43
Figura 15. Espectros de massas dos picos 1, 2, 3 e 4	44
Figura 16. Espectro de ^1H RMN do corante C.I. Disperse Blue 291	46
Figura 17. Espectro de ^1H RMN do pico 1.	48
Figura 18. Espectro de ^1H RMN do pico 2	50
Figura 19. Espectro de ^1H RMN do pico 3	52
Figura 20. Espectro de ^1H RMN do pico 4	55

	Pág.
Figura 21. Estruturas sugeridas para os picos 1 e 4 e picos 2 e 3 baseadas na proposta de tautomerismo	56
Figura 22. Cromatograma obtido após cloração do pico 2	59
Figura 23. Espectro de massa do produto obtido após reação do pico 2	60
Figura 24. Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS dos produtos da incubação do corante C.I. Disperse Blue com a enzima nitrorredutase	61
Figura 25. Espectro de massas obtido por HPLC/ESI/MS de: A) produtos resultantes da incubação do corante com a enzima nitrorredutase B) Espectro de massa do pico 3 padrão	62
Figura 26. Cromatogramas dos picos reduzidos acetilados obtidos por HPLC/ESI/MS	64
Figura 27. Espectros de massas dos picos 1, 2, 3 e 4 acetilados	65
Figura 28. Cromatogramas dos picos acetilados incubados com dGuo	66
Figura 29. Cromatogramas dos picos acetilados incubados com dGuo	67
Figura 30. Espectro de massas dos produtos resultantes da incubação dos picos 2, 3 e 4 com dGuo	68

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Relação de algumas das principais aminas aromáticas carcinogênicas	04
Tabela 2. Caracterização estrutural dos adutos formados por diversas aminas aromáticas	15
Tabela 3. Métodos para detecção de adutos	18
Tabela 4. Estruturas químicas dos PBTAs 1 a 6	20
Tabela 5. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do corante C.I. Disperse Blue 291 em $\text{DMSO}-d_6$	47
Tabela 6. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do pico 1 em $\text{DMSO}-d_6$	49
Tabela 7. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN pico 2 em $\text{DMSO}-d_6$	51
Tabela 8. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do Pico 4 em $\text{DMSO}-d_6$	53
Tabela 9. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do corante C.I. Disperse Blue 291 em $\text{DMSO}-d_6$	55
Tabela 10. Estruturas propostas e dados obtidos para os PBTAs não clorados.....	57

Lista de Abreviaturas e Siglas

CI: Índice de cores

D₂O: Óxido de Deutério

Da: Daltons

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DB 291: Disperse Blue 291

ESI: Ionização por impacto de elétrons

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

MS: Espectrometria de massas

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NAT2: *N*-Acetiltransferase 2

PBTA: Fenilbenzotriazol

PBTA não clorado: Fenilbenzotriazol não clorado

pH: Potencial hidrogeniônico

RMN: Ressonância magnética nuclear

rpm: Rotação por minuto

SIR: Gravação selecionada de íon

UV: Ultravioleta

Resumo

CARMAZEN, P.C.V., LOUREIRO, A.P.M. **Investigação de lesões em DNA induzidas por produtos de redução do corante C.I. Disperse Blue 291.** 2007. 91f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CI Disperse Blue 291 (CI DB 291) é um corante dinitrobromoaminoazobenzeno com atividade mutagênica para *S. typhimurium*, aumentada na presença de nitrorredutase, o-acetiltransferase e enzimas microsossomais (S9).

Neste estudo foram isolados e caracterizados quatro produtos da redução de DB 291 com ditionito de sódio (*in vitro*), sendo denominados 2-fenilbenzotriazóis não clorados (não-CIPBTAs). Os espectros de absorbância não apresentam o pico correspondente à ligação azo ($\lambda=613$ nm), indicando a redução dessa ligação. Espectros de massas e ^1H RMN mostram que os produtos são dois pares de tautômeros com m/z 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Esses produtos foram acetilados com piridina/anidrido acético e espectros de massas desses produtos indicam adição de grupamento acetil na molécula e formação de produtos com m/z 507 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 491 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Esses compostos foram reagidos com dGuo e obtivemos dois produtos com m/z 632 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 683 $[\text{M}+\text{H}]^+$, sendo os possíveis adutos.

A partir do composto não clorado com m/z 449 obtido após redução com ditionito de sódio, sintetizamos o análogo clorado (PBTA) após reação de cloração. Espectros de massa confirmam a formação do composto clorado com m/z 483 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Também incubamos o corante CI DB 291 com nitrorredutase/NADH. Análises por HPLC/ESI/MS indicam a formação de não-CIPBTA (m/z 449). Uma vez que não-CIPBTAs são mais mutagênicos para linhagens de *S. typhimurium* (com fração S9) que seus dinitrofenilazo corantes precursores, a conversão enzimática do corante para não-CIPBTAs pode ser uma via importante para sua bioativação.

Palavras-chaves: C.I. Disperse Blue 291, Corante dinitrobromoaminoazobenzeno, Adutos de DNA, PBTAs, PBTAs não clorados

Abstract

CARMAZEN, P.C.V., LOUREIRO, A.P.M. **investigation of DNA damage induced by products of the C.I. Disperse Blue 291 reduction** 2007. 91f. Dissertation (Master) – College of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

C.I. Disperse Blue 291 (C.I. DB 291) is a dinitrochloroaminoazobenzene dye with mutagenic activity to *S. typhimurium*, that is increased in the presence of nitroreductase, *o*-acetyltransferase and microsomal enzymes (S9).

In this study were isolated and characterized four products of the reduction of DB 291 with sodium dithionite (in vitro), named non-chlorinated 2-phenylbenzotriazoles (non-CIPBTAs). The absorbance spectra do not present the peak corresponding to the band of azo bond ($\lambda = 613$ nm), indicating that the reduction of this bond occurred. Mass spectra and ^1H NMR show that the products are two pairs of tautomers with m/z 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$ and m/z 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$. These compounds were acetylated with pyridine/acetic anhydride and their mass spectra indicate the addition of an acetyl group to the molecules and formation of products with m/z 507 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 491 $[\text{M}+\text{H}]^+$. After reaction of these compounds with dGuo we have got two products with m/z 632 $[\text{M}+\text{H}]^+$ and m/z 683 $[\text{M}+\text{H}]^+$, which are possible adducts.

Starting from the non chlorinated compound with m/z 449, obtained through the dye reduction with sodium dithionite, we have synthesized the chlorinated analogous (PBTA) after chlorination reaction. Mass spectrum confirms formation of the chlorinated product with m/z 483 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

The DB 291 dye was also incubated with nitroreductase NADH. HPLC/ESI/MS analyses indicate the formation of a non chlorinated PBTA (m/z 449). Since non-chlorinated PBTAs are more mutagenic to *S. typhimurium* strains (with S9 mix) than the parent phenylbenzotriazole dye, enzymatic conversion of this type of dye non chlorinated PBTAs may be an important way for its bioactivation.

Keywords: azo dye, nitro compounds, DNA adducts, non-chlorinated phenylbenzotriazole, chlorinated phenylbenzotriazole.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Compostos Azo, Nitro e Amino aromáticos: Potencial tóxico

Os últimos cem anos foram de franca expansão para a indústria química, mas esse progresso levou à contaminação ambiental com ampla variedade de xenobióticos. (BRUCE *et al.*, 2006). Compostos nitroaromáticos (Ar-NO₂) e azo (N=N), sobretudo corantes azo, são largamente difundidos no mercado devido à sua vasta aplicabilidade em diferentes segmentos industriais, tais como: indústrias de tingimento de tecidos, farmacêuticas e alimentícias (HE *et al.*, 2006, CHUNG *et al.*, 1992-a). Gases poluentes gerados por veículos automotores e atividades industriais são fatores que contribuem para a presença de compostos nitroaromáticos na atmosfera (MÖLLER *et al.*, 2007), elevando o risco de câncer de pulmão (BIELER *et al.*, 2007). Dentre os vários compostos nitroaromáticos existentes, 3-nitrobenzantrona (3-NBA) foi extensivamente estudado, sendo um potente mutagênico de ação direta em *Salmonella typhimurium* e carcinógeno suspeito para humanos. É encontrado em poluição emitida por veículos (MÖLLER *et al.*, 2005, ARLT *et al.*, 2002, KAWANISHI *et al.*, 1998, SUSUKI *et al.*, 1998). Diversos compostos azo (ex.: aminoazobenzenos) são genotóxicos, sendo que seu potencial mutagênico é alterado de acordo com a natureza dos grupos substituintes no anel aromático. Um exemplo é o composto 3-metoxi-4-aminoazobenzeno (3-OMe-AAB), que é um potente hepatocarcinógeno para ratos e fortemente mutagênico para bactérias, enquanto que o seu análogo 2-metoxi-4-aminoazobenzeno (2-OMe-AAB) não possui ação carcinogênica e é um fraco mutagênico para bactérias (UMBUZEIRO *et al.*, 2005 b, WATANABE *et al.*, 1982). Assim, pequenas alterações na molécula influenciam no efeito mutagênico desses compostos (TADA *et al.*, 1994, MORI *et al.*, 1986, MILLER *et al.*, 1984).

Durante o processo de biotransformação esses compostos geram aminas aromáticas (Ar-NH₂) após clivagem da ligação azo ou redução dos grupamentos nitro. Aminas aromáticas pertencem a uma das categorias de carcinógenos mais

estudadas e estão fortemente relacionadas com a incidência de diversos tipos de câncer, sobretudo câncer de bexiga (SKIPPER *et al.*, 2006, VINEIS *et al.*, 1997).

Benzidina (4-4'-diaminobifenil), um importante representante da classe das aminas aromáticas, foi largamente utilizada para fabricação de azo corantes e faz parte da composição de cigarros. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA-EUA), é classificada como carcinógeno humano, levando ao alto índice de câncer de bexiga. Contudo, a comercialização de azo corantes à base de benzidina não enfrenta problemas (MAKENA *et al.*, 2007, US-EPA, 2007) e muitos deles são mutagênicos em testes com diferentes linhagens de *Salmonella*. Esses compostos podem liberar benzidina após metabolismo por, principalmente, microrganismos intestinais e ambientais (CHUNG *et al.*, 2006, CHUNG *et al.*, 1992-b). Um importante congênere da benzidina é o 4-aminobifenil, um produto monodesaminado, que também é caracterizado pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) como carcinógeno humano. A exposição ocorre por meio da queima de combustíveis, queima de óleo de cozinha e fumaça de cigarro, ocasionando câncer de bexiga, câncer de pulmão e possivelmente câncer de mama em humanos (CHUNG *et al.*, 2007, IARC, 1989, IARC, 1972). As estruturas químicas dos compostos acima mencionados estão apresentadas na **Figura 1**.

Alimentos fritos e cozidos também têm sido alvos de estudos por apresentarem alta atividade mutagênica, conforme detectado pelo teste de Ames/*Salmonella*. Foi verificado que esses efeitos ocorrem devido à formação de aminas heterocíclicas a partir da pirólise de aminoácidos e proteínas (SYNDERWINE *et al.*, 1999, WAKABAYASHI *et al.*, 1993). Essa classe de aminas induz câncer em humanos (TURESKY *et al.*, 2007), sendo que vários adutos de DNA foram detectados no pâncreas (ZHU *et al.*, 2007), próstata (AL-BUHEISSI *et al.*, 2006), cólon e glândula mamária (WILSON *et al.*, 2007, ITO *et al.*, 1991).

Figura 1: Estruturas dos compostos nitro e azo representantes.

A carcinogênese química foi primeiramente reconhecida em 1761 pelo físico John Hill que correlacionou a incidência de pólipos nasais com a inalação prolongada de tabaco (MILLER, 1978). Logo após, Percival Pott notou a alta incidência de câncer escrotal em trabalhadores que estavam expostos à fuligem e piche durante a limpeza de chaminés (YOUNG, 2005). Aminas aromáticas são suspeitas de serem carcinogênicas desde 1895 a partir de diversos casos de câncer de bexiga documentados em trabalhadores de uma fábrica de produção de anilina na Alemanha. Em subseqüentes observações, vários países correlacionaram casos de câncer de bexiga com derivados da anilina, dentre eles a benzidina (MILLER, 1978). Aminas aromáticas foram detectadas em humanos e em diversos órgãos de diferentes espécies animais, sendo correlacionadas à indução de câncer por esses compostos. Além disso, o metabolismo diferencial entre as espécies influencia na biotransformação dessas aminas, que atingem diferentes órgãos alvos (ZENZER *et al.*, 2002). Alguns desses dados estão resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Relação de algumas das principais aminas aromáticas carcinogênicas.

Xenobiótico	Órgão alvo	Espécie animal	Referências
Benzidina	Fígado	Ratos Camundongos Hamsters	IARC, 1989.
	Bexiga	Cães, Humanos	
4-aminobifenil	Bexiga	Cães, Coelhos, Humanos	IARC, 1972. IARC, 1989.
	Fígado	Cães, Coelhos, Hamsters, Humanos, Ratos	IARC, 1972 IARC, 1989
	Glândula mamária	Ratos	IARC, 1989.
	Intestino	Ratos	
3-OMe-AAB	Fígado	Ratos	UMBUZEIRO <i>et al.</i> , 2005 b. HASHIMOTO <i>et al.</i> , 1981.

Tinturas de cabelo possuem composição variável, mas entre seus constituintes encontram-se aminas aromáticas (tinturas permanentes), compostos nitro, corantes azo (semi - permanentes) e metais pesados (temporárias). Estudos de coorte (CZENE *et al.*, 2003, SKOV *et al.*, 1994, ALDERSON, 1980) e casos - controle (ANDREW *et al.*, 2004, DOMINGUEZ *et al.*, 2001, LA VECCHIA *et al.*, 1995) mostram aumento de casos de câncer de bexiga entre usuários de tinturas, cabeleireiros e barbeiros. Entretanto, há dificuldade de correlacionar os dados de toxicidade e genotoxicidade obtidos para esses compostos *in vitro* e *in vivo* (NOHYNEK *et al.*, 2004), o que gera inconsistência para afirmação de uma ação carcinogênica. Com base nos dados existentes, a IARC classifica as ocupações

de barbeiro e cabeleireiro que envolvem exposição a tinturas no grupo 2A, prováveis carcinógenos para humanos (ANDREW *et al.*, 2004, IARC, 1993)

Em mamíferos, corantes azo e nitro compostos ingeridos podem ser reduzidos para aminas aromáticas por azorredutases e nitrorredutases presentes principalmente na microbiota intestinal, mas não é descartada a possibilidade de redução desses grupos por enzimas hepáticas (ZBAIDA *et al.*, 1990). Atividades de azorredução foram detectadas em frações microssomais e em citossol hepático (STTODART *et al.*, 1992, NESNOW *et al.*, 1988), necessitando de citocromo P-450 e NADPH para suas atividades (FUJITA *et al.*, 1981). Riboflavinas (FAD ou FMN) também podem ser requeridas para aumentar atividades NADH dependentes (FUJITA *et al.*, 1982). De acordo com Zbaida e colaboradores (1990, 1994), azo compostos que possuem substituintes fortemente captadores de elétrons são substratos para azorredutases intestinais; enquanto que compostos azo que possuem substituintes doadores de elétrons são substratos para azorredutases hepáticas (ZBAIDA *et al.*, 1994 e ZBAIDA *et al.*, 1990). No processo de redução, há clivagem da ligação azo para aminas ou a conversão do grupo nitro para grupo amina (UMBUZEIRO *et al.*, 2005 b, CERNIGLIA, *et al.*, 1995, RAFII, *et al.*, 1993, CHUNG *et al.*, 1992 b). A **figura 2** ilustra os passos reacionais envolvidos nos processos de nitro-redução e azo-redução.

Figura 2: Esquema reacional ilustrando 1) nitro-redução e 2) azo-redução (Modificado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Em 1992, Chung e Cerniglia revisaram a mutagenicidade de corantes azo a partir da relação estrutura-atividade. Verificaram que a maioria dos corantes estudados necessita de bioativação para ter atividade mutagênica e apenas uma pequena parcela desses compostos não necessita de bioativação para serem mutagênicos. Corantes azo mutagênicos são aqueles que, após azorredução são capazes de produzir porções mutagênicas (*p*-fenilenodiamina e/ou benzidina). Existem alguns corantes azo que não geram porções mutagênicas após ação de azorredutases, fato este que ainda não é bem esclarecido (CHUNG *et al.*, 1992 a). A **Figura 3** relaciona os corantes azo que não possuem atividade mutagênica após azorredução.

Figura 3: Corantes azo que não possuem atividade mutagênica após ação de azo-redutases.

A ação biológica de aminas aromáticas como agentes carcinogênicos ou genotóxicos depende das etapas de bioativação. Esses compostos podem ser oxidados por enzimas do citocromo P-450 (por exemplo, CYP1A2) para formar *N*-hidroxilaminas (BARTSCH, 1981), que por sua vez podem ser biotransformadas por enzimas de fase II, como *N,O*-acetiltransferases (NATs) ou sulfotransferases (SULTs), gerando ésteres instáveis (*N*-acetoxi ou *N*-sulfoxi-arilaminas) que irão originar íons nitrênio eletrofílicos capazes de formar adutos com o DNA (ARLT *et al.*, 2002).

Outra possível via de oxidação ocorre através da ação de peroxidases. Essas enzimas são encontradas em muitos tecidos, dentre eles bexiga, glândula mamária e neutrófilos (ZBAIDA *et al.*, 1994). O processo de oxidação mediado por peroxidases é diferente do processo mediado por citocromo P-450. No caso da ação de peroxidases há a geração de espécies radicalares que, por sua vez, podem sofrer autooxidação ou podem ser transformadas em compostos eletrofílicos capazes de reagir com o DNA (MOLLER *et al.*, 2000, ZBAIDA *et al.*, 1994).

Stiborova e colaboradores (1999) realizaram um estudo no qual verificaram o papel das peroxidases no metabolismo do corante azo alimentício Sudan I (1-fenilazo-2-hidroxinaftol). Esse composto é conhecido por causar câncer hepático e de bexiga em mamíferos (STIBOROVA *et al.*, 2002). Seu metabólito 6-OH-Sudan I, o qual é considerado um produto de detoxificação desse corante, é biotransformado por peroxidases hepáticas gerando compostos capazes de se ligar ao DNA (**Figura 4**). Tal observação indica que essas enzimas possuem importante papel na bioativação de corantes azo e seus metabólitos, gerando produtos capazes de formar adutos com o DNA (STIBOROVA *et al.*, 1999).

Figura 4: Esquema de biotransformação do Sudan I (I). Oxidação do anel produz 6-OH-Sudan I (II), 4'-6-OH-Sudan I (III), e 4'-Sudan I (IV). Redução da ligação azo produz anilina (V) e 1-amino-2-naftol (VI). Oxidação por peroxidases produz 1,2-dihidroquinaftoquinona (VII) e um íon benzenodiazônio (VIII). Uma posterior oxidação de (VII) produziu 1,2-naftoquinona (X), o qual pode ser reduzido para um radical semiquinona (IX). Durante o ciclo redox de (X), são produzidas espécies reativas de oxigênio (XI) (Modificado de Moller *et al.*, 2000).

Uma vez formados, esses adutos podem levar a mutações e iniciar o processo de carcinogênese (GEOGIARDIS *et al.*, 2001). Aminas aromáticas induzem predominantemente câncer de bexiga por serem oxidadas no fígado para as respectivas hidroxilaminas que são conjugadas com ácido glicurônico (*N*-glicuronidação) e excretadas. No pH ácido da bexiga, a ligação *N*-glicuronídeo é hidrolisada e é liberada a hidroxilamina que pode reagir diretamente com o DNA das células uroepiteliais ou ser bioativada por *o*-acetilação, gerando íons eletrofílicos capazes de reagir com o DNA (SCHERER *et al.*, 2006).

Enquanto a o-acetilação de hidroxilaminas aromáticas leva a bioativação desses compostos, *N*-acetilação de amins aromáticas é importante para sua detoxificação. Indivíduos acetiladores lentos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de câncer de bexiga quando expostos a amins aromáticas porque a via oxidativa que leva à formação de hidroxilaminas (bioativação) compete com a via de *N*-acetilação que leva à inativação (WESTWOOD *et al.*, 2007, DUPRET *et al.*, 2006, MCGRATH *et al.*, 2005, HEIN, 2002). Além disso, a disponibilidade de substrato para *N*-glicuronidação aumenta e, como mencionado anteriormente, tais conjugados são instáveis no pH baixo da bexiga, o que facilita a formação de íons nitrênio reativos. A **Figura 5** ilustra os produtos intermediários de biotransformação de amins aromáticas até formação de adutos de DNA.

Figura 5: Bioativação de amins aromáticas. **A)** Amina aromática, **B)** *N*-hidroxilamina, **C)** *N*-acetoxi., **D)** Ion nitrênio (Modificado de KIM *et al.*, 2005 e YU *et al.*, 2002).

1.2 Adutos de DNA: Mecanismos de formação envolvendo aminas aromáticas

O primeiro evento para a carcinogênese química é a ligação covalente de moléculas eletrofílicas (carcinógenos agindo diretamente ou metabólitos reativos) em bases do DNA (BAER-DUBOWSKA, 2006, VERDINA *et al.*, 2006), produzindo adutos (FARMER, 2004). Adutos de DNA possuem diferentes tempos de vida a depender de fatores como reparo do DNA e instabilidade química. Vários estudos demonstraram relação entre a presença de adutos e aparecimento de tumores e também sugerem que esses produtos sejam lesões pré-cancerígenas (BIELER *et al.*, 2007, STIBOROVA *et al.*, 2007, CUI *et al.*, 1999, RANDEATH *et al.*, 1985) (Figura 6).

Figura 6: Esquema geral para carcinogênese química envolvendo via genotóxica (Modificado de FARMER, 2004).

Há relação entre a incidência de tumores e a concentração de adutos de DNA em diversos tecidos, o que indica que os níveis de adutos de DNA podem ser utilizados como biomarcadores de risco de desenvolvimento de tumores (GAYLOR *et al.*, 1992, POIRIER *et al.*, 1991). Além disso, indicam a exposição dos indivíduos a substâncias genotóxicas (biomarcadores de dose biologicamente efetiva) (SINGH *et al.*, 2007), identificando os compostos precursores (RUNDLE, 2006).

A bioativação de aminas aromáticas gera produtos altamente eletrofílicos que são capazes de reagir com o DNA, levando à formação de adutos. A reação mais freqüente ocorre na posição C8 da guanina. Esse sítio é alvo da adição de radicais hidroxila livres (como HO[•]), mas por ser fracamente nucleofílico não reage facilmente com outras espécies eletrofílicas. A formação de adutos de aminas aromáticas na posição C8 da guanina se deve a uma reação inicial do íon nitrênio com o N7 da guanina, seguida de um rearranjo para gerar um aduto estável em C8 (**Figura 7**) (HUMPHEREYS *et al.*, 1992). O produto majoritário formado será *N*-(desoxiguanosina-8-il)arilamina (dG-C8 **aduto 1**) (Figura 8) (TAKAMURA-ENYA *et al.*, 2006).

Vários estudos evidenciam o ataque em N7 por um íon nitrênio, gerando adutos principais em C8 da guanina (ARLT *et al.*, 2006, ARLT, 2005, KADLUBAR *et al.*, 2002 SCHARER *et al.*, 2002, SHAPIRO *et al.*, 1998).

Figura 7: Mecanismo proposto para formação de adutos de aminas aromáticas a partir do ataque na posição N7 (Modificado de HUMPHREYS *et al.*, 1992).

O átomo N^2 da guanina também pode ser atacado pelo carbono eletrofílico do anel e formar 2'-desoxiguanosina- N^2 -il-arilamina (dG- N^2 **aduto 3**) (**Figura 8**), porém essa reação ocorre com menor frequência (ARLT, 2005, GUENGERICH, 2002, BROYDE *et al.*, 1997, TURESKY *et al.*, 1996). Embora em menor proporção, 2'-desoxiadenosina (dA) também é alvo para o ataque de íons arilnitrênio formando 2'-desoxiadenosina-8-il-arilamino (dA-C8 **aduto 2**) (**Figura 8**) e 2'-desoxiadenosina- N^6 -il-arilamino (dA- N^6 **aduto 4**) (**Figura 8**), os quais são análogos dos adutos de dGuo (TAKAMURA-ENYA *et al.*, 2006).

Figura 8: Formação de adutos de DNA a partir de compostos aminoaromáticos (Modificado de TAKAMURA-ENYA *et al.*, 2006).

Em um trabalho envolvendo trabalhadores da Índia expostos a benzidina e corantes à base de benzidina, realizado por Rothman e colaboradores em 1996 e 1997, foi verificado que esses compostos induzem a formação de adutos DNA – benzidina em células uroepiteliais. Dentre os adutos formados, o majoritário foi *N*-(3'-fosfodesoxiguanosina-8-il)-*N*'-acetilbenzidina, envolvendo um metabólito acetilado da benzidina (ROTHMAN *et al.*, 1997, ROTHMAN *et al.*, 1996 a, ROTHMAN *et al.*, 1996 b).

Adutos DNA-4-aminobifenil foram detectados em animais e humanos, sendo dG-C8-4-ABP o aduto principal (TRUDEL *et al.*, 2007, SCHMEISER *et al.*, 2004). Outros adutos encontrados em menor proporção foram *N*²-desoxiguanosina-4-ABP, C8-desoxiadenosina-4-ABP, 3-(desoxiguanosina-*N*²-il)-4-aminobifenil (3dG-*N*²-4-ABP), e dG-*N*²=N-4-ABP (SWAMINATHAN *et al.*, 2002 a, b). Sabbioni e colaboradores (2006) detectaram altos níveis de adutos 4-aminobifenil-hemoglobina em trabalhadores expostos a benzidina e corantes azo (SABBIONI *et al.*, 2006). A **Figura 9** ilustra os principais pontos de ataque à

desoxiadenosina e desoxiguanosina e os principais adutos formados de benzidina e 4-aminobifenil.

Figura 9: Sítios das bases do DNA com potencial para reações com eletrófilos (A) (B). Principais adutos de DNA formados a partir de 4-aminobifenil (C) e benzidina (D). (Modificado de RICKI *et al.*, 2006, ESAKA *et al.*, 2003, ZENZER *et al.*, 2002).

Kojima e colaboradores (1994) verificaram que o carcinógeno 3-metoxi-4-aminoazobenzeno (3-OMe-AAB) é altamente genotóxico por produzir vinte vezes mais adutos do que o não carcinógeno 2-metoxi-4-aminoazobenzeno (2-OMe-AAB), sendo o produto majoritário o aduto na posição C8 da guanina. Além disso, os adutos de 3-OMe-AAB induzem deleção e substituição de pares de bases, sugerindo grande alteração na conformação do DNA. Em contraste, adutos de 2-OMe-AAB induzem apenas substituição de pares de bases. Esses dados sugerem que a diferença de hepatocarcinogenicidade desses compostos depende não

somente da qualidade e quantidade dos adutos formados, mas também depende das modificações conformacionais do DNA induzidas por esses produtos (KOJIMA *et al.*, 1994). Diferentes tipos de adutos formados *in vivo* por diversas aminas aromáticas estão sumarizados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Caracterização estrutural dos adutos formados por diversas arilaminas.

Arilamina	C8-dG	C8-dA	N ² -dG	N ⁶ -dA	Referências
Benzidina	Produto majoritário				BELAND e KADLUBAR, 1985.
4-aminobifenil	Produto majoritário	Menor produto	Menor produto		SCHMEISER <i>et al.</i> , 2004. TRUDEL <i>et al.</i> , 2007. SWAMINATHAN e HATCHER, 2002 b
3-OMe-AAB	Maior produto		Menor produto	Menor produto	KOJIMA <i>et al.</i> , 1994

1.3 Técnicas para detecção de adutos de DNA

Adutos de DNA são utilizados como biomarcadores de exposição a substâncias genotóxicas e indicam a dose biologicamente efetiva das mesmas. Há intensa atividade de pesquisa no sentido de investigar *in vitro* a formação de adutos de diversos eletrófilos com bases do DNA, elucidando suas estruturas químicas. A informação estrutural permite a proposta de mecanismos de reação dos compostos originais. Já os padrões de adutos obtidos permitem a realização

de estudos experimentais em células em cultura e/ou animais onde se investigam as correlações entre níveis de adutos e dose de exposição e entre níveis de adutos e efeitos adversos, como por exemplo mutagênese e carcinogênese. Estudos epidemiológicos em humanos para verificar a correlação do potencial biomarcador com a dose de exposição e com o risco de desenvolvimento de doenças (ex.: câncer) também são feitos. Com o uso de biomarcadores validados, hoje é possível acompanhar as diversas etapas do desenvolvimento de doenças relacionadas à exposição a xenobióticos. A detecção precoce de alterações bioquímicas permite a aplicação de medidas de intervenção no sentido de evitar o desenvolvimento de doenças. Um importante exemplo seria a prevenção do câncer (WATSON *et al.*, 2004).

Para a detecção de biomarcadores, técnicas analíticas apropriadas são requeridas para fornecer exatidão e quantificação reprodutível (BRINK *et al.*, 2006). Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para detectar adutos de DNA, sendo classificadas em quatro grupos: (i) imunoenaios, (ii) imunohistoquímica, (iii) cromatografia/espectrometria de massas e (iv) pós-marcação com ^{32}P (NEHER *et al.*, 2006).

Técnicas de imunohistoquímica e de imunoensaio utilizam anticorpos que reconhecem adutos específicos de DNA. Anticorpos permitem a visualização de adutos no núcleo celular, mas pode ocorrer limitação da técnica se houver reação cruzada com estruturas similares (POIRIER *et al.*, 2004). Vantagens dessas técnicas são a detecção de adutos em tipos específicos de células em um tecido e a necessidade de pouco volume de amostra (SANTELLA, 1999).

Dentre as técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais utilizada (ESAKA *et al.*, 1993) e pode ser acoplada à técnica de espectrometria de massas (MS/MS) a fim de se obter informação estrutural dos produtos gerados (EDLER *et al.*, 2006) com agilidade, especificidade e sensibilidade (LIU *et al.*, 2005) em pequenas amostras (10-100µg) de DNA (BELAND *et al.*, 2005). A desvantagem refere-se ao alto custo do equipamento (POIRIER *et al.*, 2004).

Means e colaboradores desenvolveram em 2003 um método seletivo e sensível para detectar adutos de benzidina [N-(adenina-8-il)-benzidina] e aminofluoreno [N-(adenina-8-il)-2-aminofluoreno] utilizando HPLC acoplado à espectrometria de massas. Devido à alta sensibilidade da técnica, o limite de detecção foi de 100 fmol, correspondendo a um aduto a cada 6×10^7 bases de DNA. De acordo com os autores, o método é aplicável para quantificar adutos de tais substâncias *in vitro* e *in vivo*. Além disso, também pode ser utilizado para correlacionar exposições a aminas aromáticas e níveis de adutos gerados, bem como investigar a cinética de formação do aduto (MEANS *et al.*, 2003).

A técnica de pós-marcação com ^{32}P foi desenvolvida por Randerath e colaboradores em 1981 e compreende a hidrólise enzimática do DNA para desoxirribonucleosídeos-3'-monofosfato seguida por marcação com ^{32}P na extremidade 5'. Classicamente os produtos gerados são separados por cromatografia em camada delgada bidimensional e a detecção feita por autoradiografia. Quando foi desenvolvido, esse método permitia detectar 1 aduto a cada 10^5 nucleotídeos normais (RANDERATH *et al.*, 1981). Em estudos posteriores, Randerath e colaboradores aumentaram a sensibilidade do método ao adicionar nuclease P1 para digerir os nucleotídeos não modificados antes de serem marcados. Essa enzima catalisa a desfosforilação de desoxirribonucleosídeos-3'-monofosfato, mas raramente age sobre os nucleotídeos modificados. Desoxirribonucleotídeos sem o fosfato na posição 3' não serão substratos para fosforilação por T_4 polinucleotídeo quinase. Conseqüentemente, somente adutos não desfosforilados serão marcados com ^{32}P , originando os desoxirribonucleosídeos-3'-5'-bifosfato. Esse método modificado permite a detecção de 1 aduto a cada 10^7 - 10^{10} nucleotídeos normais (ESAKA *et al.*, 2003). O acoplamento da técnica de pós-marcação com ^{32}P à separação por HPLC com detecção de radioatividade resulta em um método altamente sensível e específico (SHIBUTANI *et al.*, 2006, ERIKSSON *et al.*, 2003), porém não fornece informações sobre as estruturas dos adutos (POIRIER *et al.*, 2004). A tabela 3 resume os métodos utilizados para detecção de adutos de DNA.

Tabela 3: Métodos para detecção de adutos.

Método	Resumo	Especificações	Desvantagens
Pós-marcação com ^{32}P	O DNA é digerido em nucleotídeos que são marcados na extremidade 5' com ^{32}P . Os adutos são separados por HPLC ou TLC.	Requer em torno de 10µg de DNA; Altamente sensível; Não requer instrumentos de alto custo.	Não permite identificar as estruturas dos adutos; Requer material radioativo; Necessita de trabalho intensivo.
Imunoensaios	Anticorpo específico para um aduto de DNA ou DNA modificado é utilizado em ensaios competitivos com diversos <i>end points</i> (radioatividade, cor, fluorescência ou quimioluminescência).	Anticorpo define especificidade; Técnica altamente sensível e barata.	Pode ocorrer reação cruzada entre anti-corpo e adutos similares; Requer grande quantidade de amostra (50-100µg) de DNA.
Imunohistoquímica	Utiliza o mesmo anti-corpo da técnica de imunoensaio e revela os adutos através de fluorescência ou por microscopia.	Permite a localização celular do aduto; Útil para pesquisa em tecido humano; Adaptável para estudos longos.	Menor sensibilidade que nos outros métodos;
Espectrometria de massas	Identificação estrutural dos adutos;	Permite identificação estrutural do composto formado ; Permite quantificação.	Aparelho de alto custo.

Modificado de POIRIER *et al.*, 2004.

1.4 Corantes azo como contribuintes para a atividade mutagênica de água potável

Efluentes industriais e domésticos são descartados em águas superficiais, como rios, mares, lagos e oceanos (NUKAYA *et al.*, 2001, SAYATO *et al.*, 1993). Algumas dessas águas contaminadas são destinadas ao abastecimento de cidades com água potável, para irrigação na agricultura e atividades recreacionais (OHE *et al.*, 2004, CLAXTON *et al.*, 1998, WHITE *et al.*, 1998). Sendo a água essencial à vida, sua poluição é um sério problema de saúde pública em muitos países (WAKABAYASHI *et al.*, 1998). Sendo assim, a identificação dos contaminantes é um primeiro passo importante para determinar sua contribuição em diversas doenças humanas, incluindo o câncer (SHIOZAWA *et al.*, 1998). Muitos trabalhos têm evidenciado que as descargas industriais e urbanas levam freqüentemente à poluição aquática e muitos compostos genotóxicos têm sido isolados desses efluentes (MASUDA *et al.*, 2004, HOUK *et al.*, 1992).

Wakabayashi e colaboradores vêm desenvolvendo um estudo desde 1997, no qual é feita a análise da qualidade das águas de diferentes rios localizados em Kyoto, Japão, os quais fornecem água para abastecimento da população local. Foi demonstrado que essas águas apresentavam atividades mutagênicas em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, principalmente sob ativação metabólica (S9) (KUSANRAM *et al.*, 1994, MARUOKA *et al.*, 1982). Baseando-se nesses fatos, seus trabalhos objetivaram identificar e caracterizar os compostos responsáveis pela mutagenicidade das águas dos rios. Em suas análises, foram isolados e identificados seis compostos mutagênicos a partir de amostras coletadas de pontos específicos de despejo de esgoto. Todos os compostos eram clorados e possuíam estrutura básica de fenilbenzotriazol, tendo sido denominados PBTA-1 (**Rio Nishitake**), PBTA-2 (**Rio Nishitake**), PBTA-3 (**Rio Nikko**), PBTA-4 (**Rio Uji**), PBTA-5 (**Rio Nishitake, Rio Katsura e Rio Oguri**), PBTA-6 (**Rio Nishitake, Rio Katsura e Rio Oguri**) (NUKAYA *et al.*, 2001, WATANABE *et al.*, 2001, SHIOZAWA *et al.*, 2000, NUKAYA *et al.*, 1998, OGURI *et*

al., 1998, SHIOZAWA *et al.*, 1998). A **Tabela 4** sumariza as estruturas desses PBTAs.

Tabela 4: Estruturas químicas dos PBTAs 1 a 6.

Estrutura química dos PBTAs	PBTA	R ₁ R ₂	Nome Químico
1	R ₁ : C ₂ H ₄ OCH ₃ R ₂ : C ₂ H ₄ OCH ₃	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
	2	R ₁ : C ₂ H ₄ CN R ₂ : C ₂ H ₅	2-[2-(acetilamino)-4-[N-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol.
	3	R ₁ : C ₂ H ₄ OH R ₂ : H	2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxietil)-amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
	4	R ₁ : H R ₂ : H	2-[2-(acetilamino)-4-amino-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol
	5	R ₁ : C ₂ H ₄ OCOCH ₃ R ₂ : C ₂ H ₄ OCOCH ₃	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-acetoxietil)amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol
	6	R ₁ : C ₂ H ₄ OH R ₂ : C ₂ H ₄ OH	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-hidroxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol

SHIOZAWA e colaboradores (1998) observaram que todos os PBTAs continham em suas estruturas grupamentos específicos, tais como bromo, cloro, acetilamino, bis(2-metoxietil)amino e grupos triazóis, o que sugeria a origem a partir de corantes presentes nos efluentes locais (NUKAYA *et al.*, 1997). De acordo com Boyer (1981) e Regart (1975), 2-fenilbenzotriazóis são formados após ciclicização de [(*o*-nitrofenil)hidrazo]benzeno ou [(*o*-aminofenil)azo]benzeno (SHIOZAWA *et al.*, 1998). Baseando-se nisso, foi suposto que o azo composto precursor poderia ser convertido para o seu correspondente 2-fenilbenzotriazol com o auxílio de um agente redutor (largamente encontrado em efluentes de indústrias de tingimento de tecidos), formando um PBTA não clorado que após cloração no próprio ambiente, geraria o PBTA (SHIOZAWA *et al.*, 1998). Foi observado também que compostos que possuem em sua estrutura química a fração 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxiacetanilida podem formar PBTAs mutagênicos, uma vez que essa porção parece ser essencial para que tal formação ocorra. Sendo assim, os PBTAs foram sintetizados a partir dos seguintes corantes azo: PBTA-1 (**Corante precursor:** 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxi-5-[bis(2-metoxietil)amino]acetoanilida) (SHIOZAWA *et al.*, 1998), PBTA-2 (**Corante precursor:** 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-[*N*-(2-cianoetil)etilamino]-4-metoxiacetanilida) (OGURI *et al.*, 1998), PBTA-3 (**Corante precursor:** 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxi-5-[(2-hidroxietil)amino]acetanilida) (SHIOZAWA *et al.*, 2000), PBTA-4 (**Corante precursor:** 5-amino-2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-amino-4-metoxiacetanilida) (NUKAYA *et al.*, 2001), PBTA-5 (**Corante precursor:** 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-[bis(2-acetoxietil)amino]-4-metoxiacetanilida/ C.I. Disperse Blue 79:1) (WATANABE *et al.*, 2001) e PBTA-6 é um produto resultante da hidrólise do PBTA 5 sob condições alcalinas. Os PBTAs não clorados foram caracterizados como: 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)-amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2*H*-benzotriazol (PBTA não clorado-1) (SHIOZAWA *et al.*, 1998), 2-[2-(acetilamino)-4-[*N*-(2-cianoetil)-etilamino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2*H*-benzotriazol (PBTA não clorado-2) (OGURI *et al.*, 1998), 2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxietil)-amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2*H*-benzotriazol (PBTA não

clorado-3) (SHIOZAWA *et al.*, 2000), 2-(2-acetilamino-4-amino-5-metoxifenil)-6-amino-4-bromo-2*H*-benzotriazol (PBTA não clorado-4) (NUKAYA *et al.*, 2001), 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-acetoxietil)amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2*H*-benzotriazol (PBTA não clorado-5). Como o PBTA-6 foi obtido a partir da hidrólise alcalina do PBTA-5, não há formação de PBTA-6 não clorado (WATANABE *et al.*, 2001).

Testes de mutagenicidade foram realizados com os compostos precursores (corantes azo), com os PBTAs não clorados e com os PBTAs. Foram utilizadas diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* com e sem indução enzimática. Para todos os PBTAs o nível de mutagenicidade na presença de fração S9 foi maior para os compostos clorados, em seguida o segundo maior índice de mutação foi obtido para os compostos não clorados e o menor nível de mutagenicidade ocorreu com o corante azo precursor. Nenhum PBTA foi mutagênico sem adição de S9, sugerindo que o passo da bioativação é importante para a atividade genotóxica desses compostos (NUKAYA *et al.*, 2001, WATANABE *et al.*, 2001, SHIOZAWA *et al.*, 2000, NUKAYA *et al.*, 1998, OGURI *et al.*, 1998).

Outros dois fenilbenzotriazóis foram sintetizados a partir de dois corantes azo utilizados em indústrias de tingimento de tecidos, sendo eles: C.I. Disperse Blue 291, 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida, e C.I. Disperse Blue 373, 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dialilamino)-4-metoxiacetanilida. Os PBTAs sintetizados foram 2-[2-(acetil-amino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol (PBTA-7) e 2-[2-(acetilamino)-4-(dialilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol (PBTA-8), a partir do corante CI Disperse Blue 291 e CI Disperse Blue 373, respectivamente (WATANABE *et al.*, 2002). Seus correspondentes não clorados foram caracterizados como, 2-[2-(acetil-amino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2*H*-benzotriazol e 2-[2-(acetilamino)-4-(dialilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2*H*-benzotriazol, respectivamente (WATANABE *et al.*, 2002). Amostras de águas destinadas para abastecimento público e que

contém esses produtos foram coletadas dos rios Nishitake, Katsura e Uji, localizados em Kyoto, Japão.

De modo geral, é proposto que para formação dos PBTAs deve ocorrer inicialmente a redução do grupo azo (por exemplo, com ditionito de sódio) para um derivado hidrazina, com subsequente ataque do nitrogênio ao nitro vizinho, gerando um derivado *N*-óxido. Em seguida há a redução do *N*-óxido e $-\text{NO}_2$ pelo agente redutor, dando origem ao PBTA não clorado. Finalmente, o produto clorado é obtido por adição de um agente clorante (ex.: hipoclorito de sódio) (SHIOZAWA *et al.*, 1998). A **Figura 10** ilustra os passos reacionais do processo de síntese de PBTAs

Figura 10: Via proposta para síntese dos PBTAs não clorados e PBTAs (modificado de WATANABE *et al.*, 2002, SHIOZAWA *et al.*, 1998,).

Estudos de mutagenicidade do PBTA-7, PBTA-8 e seus precursores realizados em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* nas mesmas condições em que os outros PBTAs foram testados apresentaram os mesmos resultados: os PBTAs foram mais mutagênicos, seguidos pelos PBTAs não clorados e a menor mutagenicidade foi obtida com o corante precursor. (WATANABE *et al.*, 2006, WATANABE *et al.*, 2002). Todos os resultados foram obtidos com adição da fração S9, pois os testes isentos dessa fração não apresentaram resultados positivos. Ambos os PBTAs foram igualmente mutagênicos (WATANABE *et al.*, 2002).

Em 2006, Watanabe e colaboradores isolaram quatro compostos mutagênicos presentes em amostras de água coletadas do rio Ho em Kyoto, Japão, o qual pertence ao complexo de rios estudados pelo grupo. Esses compostos foram identificados como PBTA não clorado-2, PBTA não clorado-3, PBTA não clorado-4 e PBTA não clorado-7. De acordo com os autores, os compostos não clorados devem ser formados no processo de tingimento utilizado pelas indústrias, a partir de corantes azo. Esse foi o segundo relato de presença de PBTAs não clorados em efluentes industriais (WATANABE *et al.*, 2006). Anteriormente o PBTA-1 não clorado havia sido identificado como contaminante minoritário do rio Nishitake em Kyoto, Japão (SHIOZAWA *et al.*, 1998).

Outros autores também têm investigado a contribuição de corantes azo para as atividades mutagênicas observadas em águas potáveis provenientes de rios. Umbuzeiro e colaboradores (2004) investigaram as possíveis fontes de efluentes causadores da freqüente atividade mutagênica detectada no Ribeirão dos Cristais, localizado na região metropolitana de São Paulo. Duas indústrias locais (A e B) foram apontadas como as causadoras da contaminação e seus efluentes com e sem tratamento foram analisados. Por tratar-se de águas submetidas a tratamento para fins de abastecimento, o teste de mutagenicidade com *Salmonella* foi adotado (UMBUZEIRO *et al.*, 2001), bem como diferentes processos de extração

De acordo com os resultados, a indústria B, a qual utiliza corantes azo em suas atividades, libera compostos genotóxicos nos efluentes com e sem

tratamento, sendo que o índice de mutagenicidade foi maior em amostras do efluente tratado, possivelmente devido à presença de compostos clorados formados após tratamento de cloração da água (OLIVEIRA *et al.*, 2006, UMBUZEIRO *et al.*, 2006). Baseando-se no fato de que corantes nitro/azo podem ser reduzidos e gerar aminas aromáticas, os autores investigaram a atividade mutagênica dessas amostras em linhagens de *Salmonella typhimurium* que expressam atividade aumentada de nitrorredutase e acetiltransferase. Os testes demonstraram mutagenicidade positiva em ambas as linhagens.

Considerando que esses contaminantes poderiam afetar a qualidade da água potável produzida pela estação de tratamento localizada próxima ao local de descarte dessa indústria, amostras dessa água e do sedimento do rio foram coletadas para análise. Foi verificada atividade mutagênica direta das amostras de água potável e mutagenicidade indireta das amostras coletadas do sedimento. Os autores concluíram que a descarga de corantes azo contribuía para a atividade mutagênica encontrada no Ribeirão dos Cristais (UMBUEIRO *et al.*, 2004).

A fim de verificar quais compostos seriam os responsáveis por essa atividade mutagênica, Umbuzeiro e colaboradores (2005 a) detectaram por cromatografia em camada delgada a presença de três corantes. De acordo com as suas características, esse conjunto constituía um composto preto que é utilizado comercialmente. Com base na eluição cromatográfica, um dos produtos era o C.I. Disperse Orange 37 (laranja), o outro era o C.I. Disperse Violet 93 (violeta) e o outro era o C.I. Disperse Blue 373 (azul). Foi verificado que na presença da fração S9, o C.I. Disperse Blue 373 contribuía para 2,3 % da atividade mutagênica do efluente não tratado e para 71,5 % da atividade mutagênica do efluente tratado. Já o C.I. Disperse Orange na presença de fração S9 contribui para 0,5 % da atividade mutagênica do efluente não tratado e para 6% da atividade mutagênica do efluente tratado (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Figura 11: Estruturas químicas dos corantes que compõem o composto comercial preto (Modificado de UMBUZEIRO *et al* 2005 a).

Ensaio de mutagenicidade também foram realizados com o composto comercial preto, o qual é uma mistura dos três corantes. Resultados deste teste mostraram atividade mutagênica na presença das linhagens TA98 (baixa expressão de nitrorredutase) e YG1041 (alta expressão de nitrorredutase e *o*-acetiltransferase) com e sem indução enzimática. Ao comparar a mutagenicidade obtida das duas linhagens com e sem indução enzimática, observou-se que a atividade mutagênica para YG1041 com indução enzimática foi cerca de 20 vezes maior do que a resposta mutagênica gerada para TA98. Esses resultados sugerem que as enzimas nitrorredutase e *o*-acetiltransferase sob indução enzimática são importantes para a atividade mutagênica desse composto.

Umbuzeiro e colaboradores (2005 a) também avaliaram de forma isolada a atividade mutagênica dos componentes do composto preto: C.I. Disperse Violet 93, C.I. Disperse Blue 373 e C.I. Disperse Orange 37. As condições adotadas para este ensaio foram as mesmas condições utilizadas para o composto comercial

preto. Foram utilizadas então, as linhagens YG1041 (alta expressão de nitrorredutase e *o*-acetiltransferase) e TA98 (baixa expressão de nitrorredutase) com e sem indução enzimática. Os resultados deste ensaio apresentaram mutagenicidade similar à obtida do composto comercial preto. Os compostos C.I. Disperse Violet 93, C.I. Disperse Blue 373 e C.I. Disperse Orange 37 apresentaram atividade mutagênica nas linhagens TA98 e YG1041 na presença e ausência de indução enzimática. Os ensaios realizados sob indução enzimática apresentaram aumento da atividade para os compostos C.I. Disperse Blue 373 e C.I. Disperse Violet 93 em relação a atividade mutagênica obtida do composto C.I. Disperse Orange 37, sob indução enzimática. Com esses resultados, os autores concluíram que as enzimas nitrorredutase e *o*-acetiltransferase sob indução enzimática são importantes para a atividade mutagênica tanto dos três compostos isolados (C.I. Disperse Violet 93, C.I. Disperse Blue 373 e C.I. Disperse Orange 37) quanto para os três compostos juntos, os quais formam o composto comercial preto.

Ratos que receberam doses orais dos efluentes contaminados do Ribeirão dos Cristais desenvolveram criptas aberrantes, demonstrando que esses efluentes contêm substâncias mutagênicas e carcinogênicas. Tal observação gera preocupação quanto ao risco de desenvolvimento de doenças pela população que esteja se expondo cronicamente a essa água (LIMA *et al.*, 2007). O corante C.I. Disperse Blue 373 presente na água pode sofrer redução e originar o PBTA não clorado, com subsequente formação do PBTA devido ao tratamento de cloração da água (UMBUZEIRO *et al* 2005 a).

1.5 C.I. Disperse Blue 291 (DB 291)

Como mencionado anteriormente, o corante C.I. Disperse Blue 291 (DB 291, **Figura 12**) é descartado em efluentes de indústrias têxteis, sendo que os produtos da sua redução (PBTA não clorado-7 e PBTA-7) foram detectados em amostras de água coletadas de rios no Japão (WATANABE *et al.*, 2006, WATANABE *et al.*, 2002). Esse corante possui em sua estrutura a porção 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxiacetanilida comum aos corantes dispersos que originam PBTA mutagênicos (ex.: Disperse Blue 373, Disperse Blue 79:1). De fato, o PBTA não clorado-7 e o PBTA-7 sintetizados a partir do DB 291 foram claramente mutagênicos para quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, YG1024 e YG1029) na presença de fração S9. A mutagenicidade em TA98 (PBTA-7, 43.000 revertentes/nmol, PBTA não clorado-7, 1520 revertentes/nmol) foi maior que em TA100 (WATANABE *et al.*, 2006).

Figura 12: Estrutura química do corante azo 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida (C.I. Disperse Blue 291). (Modificado de UMBUZEIRO *et al.*, 2005 b).

O mesmo ocorreu com a linhagem YG1024 em relação à YG1029 na presença de S9, as quais derivam de TA98 e TA100, respectivamente, e produzem níveis aumentados de *o*-acetiltransferase. Tal fato indica que esses compostos levam mais a alterações do quadro de leitura do que a substituições de pares de base, uma vez que as linhagens TA98 e sua derivada YG1024 detectam alterações do quadro de leitura e as linhagens TA100 e YG 1029 detectam substituições de pares de base (WATANABE *et al.*, 2006, WATANABE *et al.*, 2002). A mutagenicidade em YG1024 (PBTA-7, 1.430.000 revertentes/nmol; PBTA não clorado-7, 178.000 revertentes/nmol) foi maior que em TA98, indicando que a biotransformação via acetiltransferase é importante para a indução de danos ao DNA (WATANABE *et al.*, 2006, WATANABE *et al.*, 2002). Amostras de água coletadas de rios no Japão que estavam contaminadas com PBTA-7 e PBTA não clorado-7 foram altamente mutagênicas para YG1024 na presença de fração S9 (> 1.000.000/g de blue rayon) e a contribuição do PBTA-7 para a mutagenicidade das amostras foi estimada em cerca de 15,7% (WATANABE *et al.*, 2002). Apesar da menor mutagenicidade (em comparação com os respectivos PBTAs), os PBTAs não clorados foram identificados como principais constituintes mutagênicos nas frações altamente mutagênicas obtidas do rio japonês (rio Ho) no estudo de Watanabe e colaboradores (2002). Com base nos dados de mutagênese dos PBTAs e PBTAs não clorados, é importante que sejam realizados estudos para verificação de sua atividade biológica, incluindo a investigação de ocorrência de lesões em DNA e carcinogênese.

Estudos realizados com PBTA-2 mostraram que o mesmo induz a formação de micronúcleos e poliploidia em duas linhagens celulares de hamster chinês (CHL e V79-MZ), sendo os maiores efeitos observados nas células V79-MZ. Os efeitos observados foram associados a alterações dos filamentos de actina causados pelo PBTA-2, tendo sido sugerido que PBTA-2 possui atividade mimética de citocalasina B (MATSUOKA *et al.*, 2001). Utilizando as mesmas linhagens celulares, Matsuoka e colaboradores testaram os efeitos de dois PBTAs (PBTA-1 e PBTA-2) e seus precursores (PBTAs não clorados-1 e 2 e respectivos corantes azo), analisando a formação de micronúcleos, células polinucleares e

células mitóticas. Apenas o corante azo-1 necessitou de ativação via S9 para causar danos celulares. Os demais compostos testados atuaram diretamente. Os corantes azo induziram a formação de núcleos multilobulados, tendo sido sugerido que eles afetam não apenas o DNA, mas também proteínas estruturais e reguladoras envolvidas na divisão celular. Os PBTA-1 e 2 levaram à aneuploidia e poliploidia, respectivamente, e os PBTA não clorados induziram a formação de micronúcleos (MATSUOKA *et al.*, 2001).

Outro estudo realizado por Masuda e colaboradores demonstrou através de ensaio cometa e teste de micronúcleo (*in vivo*), genotoxicidade produzida por PBTA-6 em peixes-dourados (*Carassius auratus*). O teste de micronúcleo foi realizado em células branquiais e eritrócitos periféricos de peixes-dourados e mostrou aumento na incidência de micronúcleos em células branquiais a partir de 48h até 96h após injeção intraperitoneal de PBTA-6 (50mg/kg) e diminuindo a incidência de micronúcleos após 144h da injeção. PBTA-6 induziu formação de micronúcleos de forma dose-dependente (1-100 mg/Kg), tendo significativo aumento após injeção das doses de 50 mg/kg e 100 mg/Kg. Por outro lado, não foram observados aumentos significativos de micronúcleos em eritrócitos periféricos. Houve indução de fragmentação do DNA, avaliada pelo ensaio cometa, em eritrócitos periféricos de peixes-dourados 6 horas após a injeção intraperitoneal de PBTA-6 (50mg/Kg)

Danos ao DNA foram associados à exposição por PBTA-6 foram avaliados pelo teste de células individualizadas em gel de agarose (ensaio cometa) *in vivo*. Medidas de DNA no momento da cauda e na intensidade da cauda em eritrócitos periféricos, aumentaram significativamente após 6 horas da exposição por injeção intraperitoneal de PBTA-6 (50 mg/Kg) e diminuíram após 9 horas de exposição. Medidas de DNA tanto no momento da cauda quanto na intensidade da cauda, aumentaram por dose-dependente durante exposição ao PBTA-6 em escala de doses de 1-50 mg/Kg (Masuda *et al.* 2004).

Esses estudos confirmam a genotoxicidade desenvolvida tanto por PBTAs quanto por PBTAs não clorados, sendo necessário conhecer melhor os mecanismos pelos quais o DNA é lesado após exposição por essas substâncias.

O produto comercial C.I. Disperse Blue 291 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida foi testado por Umbuzeiro e colaboradores (2005) quanto à sua atividade mutagênica em *S. typhimurium*. Diferentes linhagens de *Salmonella* foram utilizadas sob condições oxidativas e redutivas a fim de avaliar a influência das enzimas nitrorredutase, o-acetiltransferase, azorredutase, citocromo P-450 no mecanismo de bioativação desse composto. Linhagens como TA1535 e TA100 foram utilizadas para verificar se o corante seria capaz de induzir mutação por substituição de pares de bases e linhagens como TA1537, TA1538 e TA98 também foram utilizadas para verificar mutação por alteração do quadro de leitura de bases, na presença e ausência de fração S9. Todas as linhagens apresentaram resultados positivos, exceto a linhagem 1535 e foi verificado que o corante é capaz de causar os dois tipos de mutação. Além disso, a adição da fração S9 aumentou a resposta mutagênica em todas as linhagens, exceto em YG1041 (UMBUIZEIRO *et al.*, 2005 b).

Para verificar o papel da enzima nitrorredutase na biotransformação do corante DB 291, linhagens de *Salmonella* com baixa expressão (TA98NR) e alta expressão de nitrorredutase (YG1041) também foram testadas na presença e ausência de fração S9. Na ausência de S9 não foi detectada resposta mutagênica pela linhagem com baixa expressão de nitrorredutase (TA98NR), demonstrando que essa enzima é requerida para a ativação do corante. Já na presença de S9, a atividade mutagênica foi aumentada sugerindo que o citocromo P-450 possui importante papel na bioativação do corante, provavelmente na redução dos grupos nitro. A linhagem que possui alta expressão de nitrorredutase produziu resposta mutagênica altamente elevada na presença de S9 quando comparada à resposta produzida por TA98NR. Esse fato sugere que a enzima nitrorredutase é fundamental para bioativação do corante DB 291 (UMBUIZEIRO *et al.*, 2005 b).

A fim de verificar o papel da enzima o-acetiltransferase na bioativação do corante, a linhagem TA98DNP6 (baixa expressão de acetiltransferase) foi testada

na ausência da fração S9. Não houve resposta mutagênica, contudo um leve aumento foi verificado quando na presença de S9. Utilizando linhagens YG1024 e YG 1041 (alta expressão de *o*-acetiltransferase) houve grande aumento na mutagenicidade, sugerindo que atividade *o*-acetiltransferase é mais importante para bioativação do corante do que as enzimas microsossomais e atividade nitrorredutase. Esse fato pode ser explicado devido ao produto reduzido (hidroxilamina ou amina) ser acetilado por *o*-acetiltransferase e gerar espécies reativas (UMBUZEIRO *et al.*, 2005 b).

O papel da enzima azorredutase também foi testado para verificar possibilidade de a ligação azo ser clivada por esta enzima. Azul de tripan é um corante que gera respostas negativas no teste de *Salmonella*, contudo quando acrescido de flavinamononucleotideo e outros co-fatores necessários à clivagem da ligação azo, a coloração azul desaparece indicando positividade na clivagem da ligação azo. Quando o mesmo foi testado para DB 291, a coloração não se alterou, indicando que a enzima azorredutase não clivou a ligação azo presente em DB 291 (UMBUZEIRO *et al.*, 2005 b).

Espectros de mutação também foram analisados a fim de entender os diferentes tipos de mutação que DB 291 induz. DB 291 foi capaz de causar alterações no quadro de leitura de bases, revertendo a mutação em his3052 e especialmente nas linhagens TA98, YG1021, YG1024 e YG1041 contendo o plasmídio pKM 101 e mutações de pares de bases (hisG46). Análises realizadas nos espectros de mutação do corante demonstraram que o mesmo é capaz de alterar todos os tipos de bases, exceto TA para CG e TA para GC (UMBUZEIRO *et al.*, 2005 b).

Sabendo que o corante C.I. Disperse Blue 291 é mutagênico em bactérias (UMBUZEIRO *et al.*, 2005 b), como descrito acima, é importante que se inicie a investigação de possíveis vias de bioativação do mesmo para intermediários capazes de lesar o DNA.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Sintetizar produtos provenientes da redução do corante C.I. Disperse blue 291 a fim de obter padrões e verificar a formação desses produtos por redução enzimática. Acetilar os produtos sintetizados a fim de gerar produtos passíveis de reagir com uma base do DNA e investigar a formação de adutos.

Objetivos específicos

1. Síntese, isolamento e caracterização de PBTAs não clorados do C.I. Disperse Blue 291;
2. Acetilação dos PBTAs não clorados e incubação com dGuo para investigar a formação de adutos;
3. Investigar a possibilidade de formação de PBTAs não clorados do C.I. Disperse Blue 291 a partir da redução enzimática do corante por nitrorredutase de *Escherichia coli in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

1. HPLC/PDA: Análises cromatográficas e purificação dos produtos foram realizadas em sistema de HPLC da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan). Este sistema inclui duas bombas (LC-20AT), um detector de arranjo de diodos (modelo PDA- 20AV), um auto-injetor Proeminence (SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP), controlados por um módulo de comunicação (CBM-20A) e o *software* LC-Solution. Foi utilizada coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) da Phenomenex (Torrance,CA) com temperatura mantida em 20 °C pelo forno.
2. HPLC/detecção eletroquímica: Sistema constituído por uma bomba (LC-10 AD, Shimadzu), um injetor Rheodyne (modelo 9125i, Cotati, CA), um detector de absorbância (SPD-10A, Shimadzu) e um detector eletroquímico Coulochem II (ESA, Chemsford, MA) controlados por um módulo de comunicação (CBM 10A, Shimadzu) e o *software* Class LC 10 AWS (Shimadzu). A eluição foi feita através de uma coluna Luna C18 (2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5µm, Phenomenex) com a fase móvel constituída por 8% de metanol em tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 5,5) a um fluxo de 1 mL/min e temperatura de 18°C. Nessas condições o tempo de retenção de 8-oxodGuo foi de aproximadamente 25 min. Os potenciais dos eletrodos 1 e 2 do detector eletroquímico foram fixados em + 130 mV e + 280 mV para detecção de 8-oxodGuo. A eluição dos nucleosídeos não modificados foi monitorada simultaneamente por absorbância a 254 nm. Curvas de calibração de 8-oxodGuo e dGuo nos intervalos das quantidades esperadas nas amostras de DNA foram obtidas para a quantificação e, em seguida, a fração molar 8-oxodGuo/dGuo presente em cada amostra de DNA foi determinada. Todos os solventes foram previamente filtrados e degaseificados.

3. HPLC/UV/ESI/MS: As análises foram conduzidas utilizando-se um espectrômetro de massas Quatro II (Micromass, Manchester, U.K.) acoplado a um sistema de HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japan), consistindo de um auto-injetor (SIL10AD/VP), um injetor Rheodyne (Cotati, CA), uma válvula comutadora de fluxo (FCV-12AH), duas bombas (Class LC 10AD) e detector de absorvância (SPD-10 AV/VP) controlados por um comunicador (SCL-10A/VP-CBM 10A) e o *software* Class-VP (Shimadzu) para injeção das amostras. A temperatura da fonte foi ajustada para 100°C e os fluxos dos gases de secagem e nebulização (nitrogênio) para 350 e 10 L/h, respectivamente. O potencial do capilar foi ajustado para 3,10 kV e do eletrodo para 0,3 V. Simultaneamente foi feita a detecção por absorvância a 260 nm. Os dados foram processados com o software Masslynx 3.2 (Micromass). A análise cromatográfica foi realizada em coluna Luna C18(2) (150 mm x 2 mm i.d., 3 µm) da Phenomenex, (Torrance, Ca).
4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN): Espectros unidimensionais de ¹H RMN foram adquiridos a 27 °C utilizando um espectrômetro de ressonância magnética nuclear DPX 300 (Bruker Advance, Rheinstatten, Alemanha). As amostras foram solubilizadas em DMSO-*d*₆ ou em uma mistura de DMSO-*d*₆ / D₂O e o solvente foi utilizado como referência.
5. Centrífugas: modelos 5702R, 5804R e Mini-Spin Plus 5415D (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).
6. pHmetro: Aferições de pH foram feitas em um potenciômetro da Denver Instrument Basic Model CO31603098 (Sigma).
7. Balança: Foi utilizada balança analítica da Bioprecisa (Eletronic Balance) modelo FA 2104N.
8. Agitador de tubos Thermomixer 5436 da Eppendorf (Alemanha).

3.2 Reagentes

- Acetonitrila grau HPLC: **Merck** (Darmstadt, Alemanha).
- Água deionizada obtida por sistema Milli-Q com filtro microbiológico de 0,2 µm com padrão de qualidade 18.2 MΩ·cm: **Millipore** (Bradford, MA, USA).
- Carbonato de sódio: **Mallinckrodt Chemical** (Paris, França).
- Corante comercial C.I. Disperse Blue 291 {2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-etoxiacetanilida}, CAS n°. 56548-64-2, doado pela **Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (CETESB)**.
- Dióxido de Manganês (MnO₂): **Merck** (Darmstadt, Alemanha).
- Ditionito de Sódio (Na₂S₂O₄): **Merck** (Darmstadt, Alemanha).
- 2'-Desoxiguanosina: **Merck** (Darmstadt, Alemanha).
- Etanol (*Pro Analysi.*): **Cinética Química** (São Paulo, Brasil).
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄): **Merck** (Darmstadt, Alemanha).
- Metanol: **Merck** (Darmstadt, Alemanha).
- Nitrorredutase e *E. coli*: **Sigma Chemical Co.** (St. Louis, MO).
-
- Todos os outros reagentes foram obtidos da **Sigma Chemical Co.** (St. Louis, MO).

3.3. Redução do corante C.I. Disperse Blue 291 com sulfito de sódio (Na₂S₂)

O corante (0,0006 g) foi incubado com 300 µL de acetonitrila, 500 µL de uma solução água/etanol (1:1) e 0,004 g de Na₂S₂ à temperatura ambiente por 18 horas, sob agitação (0,165 G). Incubação controle foi feita na ausência de Na₂S₂ nas mesmas condições.

Ao término da incubação observamos alteração da coloração de azul escuro para roxo, indicando alguma alteração nos grupos cromóforos. Os produtos foram analisados por HPLC/PDA. A coluna foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (de 0 a 60 min, 30 a 100% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/ min. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 700 nm.

Análise dos produtos também foi feita por HPLC/UV/ESI/MS, **item 3** de Equipamentos, sendo que a coluna foi eluída com um gradiente de ácido

fórmico 0,1% e acetonitrila (de 0 a 60 min, 30% a 100% de acetonitrila) a um fluxo de 0,12 mL/min.

3.4. Redução do corante C.I. Disperse Blue 291 com ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

Outra alternativa para obtenção de aminas e hidroxilaminas aromáticas a partir do corante foi através do uso de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Esse composto é muito utilizado por indústrias de tingimento de tecidos que liberam para o meio ambiente o corante reduzido com alta atividade mutagênica.

A uma amostra de corante (5 mg) foram adicionados 0,018 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ e 200 μL de solução saturada de Na_2CO_3 (Protocolo adaptado de SCHEUERMAN et al., 2000). Incubou-se a 37 °C/sob agitação de 0,165 G por 16 horas. Foi obtida uma solução amarelada com um precipitado branco. As amostras foram solubilizadas com água e filtradas através de filtros de 0,2 μm para obtenção de soluções límpidas.

3.5. Análise dos produtos de redução do corante C.I. Disperse Blue 291 por HPLC/PDA

Alíquotas das soluções obtidas no item 3.4 foram, então, injetadas em um sistema de HPLC/PDA. A coluna foi eluída com um gradiente de água e acetonitrila (de 0 a 60 min, 5 a 100% de acetonitrila) a um fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 700 nm.

3.6. Análise dos produtos de redução do corante C.I. Disperse Blue 291 por HPLC/UV/ESI/MS

Os produtos que eluíram em 18,5 min, 21 min, 25 min e 35 min na condição de HPLC descrita no item 3.5 foram coletados e secos a vácuo. Cada um foi ressuspenso em água e uma alíquota foi injetada no sistema de HPLC/UV/ESI/MS, item 3 de Equipamentos, sendo que a coluna foi eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila (de 0 a 60 min, 5% a 100% de acetonitrila) a um fluxo de 0,12 mL/min. Amostras obtidas como descrito no item 3.4 também foram analisadas diretamente por HPLC/UV/ESI/MS.

3.7. Análise do corante C.I. Disperse Blue 291 e seus produtos de redução por ^1H RMN

O corante foi previamente separado do dispersante presente na amostra comercial por HPLC/UV a fim de evitar que o mesmo interferisse nas análises de ^1H RMN. Sendo assim, tanto o corante (sem dispersante) quanto os seus produtos de redução foram solubilizados individualmente em 750 μL de $\text{DMSO-}d_6$ ou $\text{DMSO-}d_6 / \text{D}_2\text{O}$ e acondicionados em tubos para RMN para posterior análise.

3.8. Acetilação dos produtos reduzidos coletados e incubação com dGuo

Os produtos coletados e secos foram ressuspensos em 500 μL de piridina e foi feita adição de anidrido acético (40 μL). As amostras foram liofilizadas, ressuspensas em tampões: Acetato de sódio (pH 4/50 mM), Fosfato de sódio (pH 7.4/50 mM e pH 9/50 mM) e Carbonato de sódio (pH 11/50 mM) e incubadas com dGuo por mais um dia (37°C/sob agitação 0,165 G). Incubações controles foram feitas e, ao final, os produtos das incubações com dGuo foram analisados por HPLC/PDA e HPLC/ESI/MS, como descrito nos itens 3.5 e 3.6.

3.9. Determinação da absortividade molar dos quatro produtos reduzidos coletados

Para determinação da absortividade molar de cada produto reduzido, preparamos uma solução mãe de cada produto (1 mg / mL) e a concentração molar de cada solução foi calculada com base nas massas moleculares dos produtos (conhecidas a partir dos espectros de massas). As soluções foram diluídas 1000 vezes para determinação da absorbância em 250 nm. Os valores de absorbância obtidos foram divididos pelas concentrações molares das soluções diluídas, sendo calculados, assim, os seguintes valores de absortividade molar (ϵ): Produto 1, $\epsilon_{250 \text{ nm}} = 6977 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Produto 2: $\epsilon_{250 \text{ nm}} = 23767 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Produto 3: $\epsilon_{250 \text{ nm}} = 17937 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Produto 4: $\epsilon_{250 \text{ nm}} = 11628 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.10. Cloração do pico 2 com hipoclorito de sódio

Ressuspendemos 300µg do pico 2 em 300µL de diclorometano. Retiramos 50 µL dessa solução e adicionamos 1 mL de diclorometano e gotejamos lentamente 300µL de solução de hipoclorito de sódio (contendo no mínimo 5% de cloro livre). Agitamos por cerca 5 minutos e em seguida, centrifugamos (0.3 G/2 minutos/temperatura ambiente) para separar as duas fases formadas. A fase orgânica foi separada, liofilizada e analisada por HPLC/UV/ESI/MS, conforme método descrito no item **3.6**.

3.11. Redução do corante CI Disperse Blue 291 com nitrorredutase

O corante em solução (1µg + 10 µl DMSO) foi incubado com 1 unidade da enzima nitrorredutase e 2 unidades de NADH em tampão Fosfato de Sódio (50 mM, pH 7) em quantidade suficiente para ajustar o volume final da incubação para 750 µL. A incubação ocorreu por 4 horas a 37°C, sob agitação (0,165 G). A solução incolor obtida foi analisada por HPLC/UV/ESI/MS, conforme descrito no item **3.6**.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão:

Com base em dados da literatura sobre a biotransformação de nitro-azo-compostos para a formação de intermediários reativos, sabemos que a redução de grupos nitro ($-\text{NO}_2$) e/ou azo ($-\text{N}=\text{N}-$) é o passo inicial. Após redução desses grupos para aminas e/ou hidroxilaminas aromáticas o próximo passo importante é a acetilação dos grupos reduzidos. Devido ao radical acetil ($-\text{COCH}_3$) ser instável, é eliminado rapidamente formando um íon nitrênio (^+NH) o qual é altamente reativo e capaz de reagir com bases do DNA. Sendo assim, nossa proposta para obtenção de metabólitos reativos é dada por uma seqüência de reações envolvendo:

- i. Redução inicial dos grupos nitro e azo através do uso de soluções de sulfito de sódio ou ditionito de sódio para obtenção de aminas aromáticas e/ ou hidroxilaminas aromáticas (método descrito por NIU *et al.*; 1998);
- ii. Acetilação das aminas e hidroxilaminas aromáticas utilizando uma solução de anidrido acético / piridina (método descrito por PLATT *et al.*, 2002),
- iii. Incubação dos produtos resultantes da reação de acetilação com 2'-desoxiguanosina para investigar formação de adutos.

Realizamos, portanto, a incubação do corante com Na_2S_2 para obtenção dos produtos reduzidos, como descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos. Na **Figura 13** estão apresentados os cromatogramas das incubações na ausência e presença de Na_2S_2 .

Figura 13: Cromatogramas obtidos por HPLC/UV ($\lambda = 250$ nm), conforme descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos. **A)** Incubação controle (corante + ACN + etanol) **B)** Espectro de absorvância do corante ilustrando banda em 613 nm referente à ligação azo **C)** Incubação do corante com Na_2S_2 .

Os produtos da incubação do corante com Na_2S_2 foram injetados no sistema de HPLC/UV/ESI/MS descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos. Espectros de massas dos produtos gerados foram obtidos no intervalo de 100 a 900 m/z , mas não foi possível a observação de íons correspondentes às massas esperadas no caso da redução de $-\text{NO}_2$ e/ou $-\text{N}=\text{N}$. Resolvemos, portanto, utilizar ditionito de sódio como descrito no item 3.4 de Materiais e Métodos para redução do corante. Gostaríamos de ressaltar a importância em seguir cada passo do protocolo de redução utilizando ditionito de sódio, pois se trata de um protocolo que sofreu alterações gerais até obtermos completa redução do corante C.I. Disperse Blue 291. A solução de carbonato de sódio deve estar devidamente saturada a fim de tornar o pH do meio alcalino (pH 12) para que ocorra a reação de redução. Outro fator importante é o tempo e temperatura da incubação que é recomendado que seja de dezesseis horas a 37 °C; do contrário a redução não ocorre (tempo de incubação inferior à 16 horas) ou ocorre degradação dos produtos (tempo de incubação superior à 16 horas). E por fim, a concentração de ditionito de sódio a ser utilizada na incubação deve ser três vezes maior do que a concentração do corante a ser reduzido. Esse protocolo foi adaptado de SCHEUERMAN e colaboradores (2000) Na **Figura 14** estão apresentados os cromatogramas dos produtos obtidos na reação (HPLC/UV, $\lambda = 240$ nm, condição descrita no item 3.5 para HPLC/UV/ESI/MS) e seus respectivos espectros de absorbância. Podemos observar em todos os espectros a ausência da banda correspondente ao grupo cromóforo azo, que apareceria em 613 nm, demonstrando que houve redução dessa ligação. Esses produtos foram purificados e injetados no sistema de HPLC/UV/ESI/MS como descrito no item 3.6. Na **Figura 15** observamos os espectros de massas desses produtos e suas respectivas estruturas. Por possuir um átomo de bromo, as estruturas apresentadas tiveram suas massas calculadas considerando-se o isótopo ^{81}Br (a abundância isotópica do ^{79}Br é 50,69% e do ^{81}Br é 49,31%). A observação dos dois isótopos do bromo nos espectros ajuda a identificar a molécula do corante. Verificamos que os produtos 1 e 4 apresentam o mesmo íon pseudo-molecular e mesmo padrão de fragmentação. O mesmo ocorre entre os produtos 2 e 3. Entretanto, no caso dos produtos 1 e 2 observamos um íon correspondente à adição de 80 Da ao íon do corante reduzido, o que ainda não conseguimos explicar.

Figura 14: Cromatograma obtido por HPLC/UV ($\lambda = 240$ nm) dos produtos resultantes da reação do corante C.I. Disperse Blue 291 com ditionito de sódio e seus respectivos espectros de absorvância. Método descrito nos itens 3.4, 3.5 e 3.6.

Figura 15: Espectros de massas respectivos aos picos 1, 2, 3 e 4 indicados na figura 14. Nos espectros está indicada a massa isotópica maior (abundância isotópica do ⁷⁹Br é 50,69 % e do ⁸¹Br é 49,31 %).

Obtivemos os espectros de ^1H RMN do corante DB 291 e dos produtos 1, 2, 3 e 4 purificados (**Figuras 16, 17, 18, 19 e 20**; Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9). Os deslocamentos químicos dos prótons do corante C.I. Disperse Blue 291 e do pico 2 foram comparados aos descritos na literatura para o corante (C.I. Disperse Blue 291) e 2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol (PBTA não clorado-7) (WATANABE et al., 2002, 2006) (**Tabelas 5 e 7**).

Ao compararmos os dados de ^1H RMN dos produtos 2 e 3 (**Figuras 18 e 19**, Tabelas 7 e 8), observamos que os prótons dos anéis no produto 3 estão deslocados 1 a 2 ppm para campo mais alto em relação aos dos produtos 2. O mesmo ocorre entre os produtos 1 e 4 (prótons dos anéis no produto 4 estão deslocados 1 a 2 ppm para campo mais alto em relação ao do produto 1. **Figuras 17 e 20**, Tabelas 6 e 9). É comum entre tautômeros este tipo de alteração do deslocamento químico de prótons, uma vez que as mudanças de posição das duplas ligações existentes na molécula a fim de se manter quimicamente estável contribuem para a “blindagem” e/ou “desblindagem” dos mesmos. Os dados de ^1H RMN obtidos nos permitiram a observação de um padrão de alteração do deslocamento dos prótons aromáticos dos produtos 3 e 4 em relação aos seus respectivos isômeros, o que pode indicar a semelhança estrutural entre os produtos 1 e 2 e entre os produtos 3 e 4. Baseando-se nestas informações, sugerimos algumas estruturas químicas fundamentadas na proposta de tautomerismo existente entre os picos 2 e 3 e picos 1 e 4; porém, sem correlacionar essas estruturas com seus respectivos picos uma vez que precisamos de mais informações para tal atribuição (**Figura 21**).

Em todos os espectros de ^1H RMN dos produtos reduzidos observamos os sinais correspondentes aos prótons dos grupos metila, metilênicos, amino e aromáticos. A concentração obtida do produto 2 foi maior que a obtida dos outros produtos e por isso a visualização do espectro é melhor, sendo a atribuição dos sinais mais clara. A re-injeção das amostras no sistema de HPLC/PDA após a obtenção dos espectros de ^1H RMN mostrou a presença de contaminantes que podem ser resultantes da degradação dos produtos previamente purificados. Tais contaminantes geraram sinais nos espectros de ^1H RMN que não foram atribuídos às estruturas dos produtos estudados. Para a atribuição dos sinais de $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$, e $-\text{OH}$, foi adicionada uma alíquota de

D₂O à solução previamente preparada em DMSO-*d*₆ e novamente obtido o espectro. Os prótons de –NH, –NH₂, e –OH trocam rapidamente com o deutério da água e os respectivos sinais são suprimidos dos espectros. Um sinal de próton trocável adicional aparece nos espectros de ¹H RMN dos produtos 1 e 4 e, de acordo com a estrutura proposta, esse sinal pode ser atribuído ao grupo –OH da hidroxilamina presente nas duas estruturas (isômeros).

Figura 16: Espectro de ¹H RMN do corante C.I. Disperse Blue 291 obtido em um equipamento de 300MHz em DMSO-*d*₆, como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos.

Tabela 5: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do corante C.I. Disperse Blue 291 em $\text{DMSO}-d_6$.

Disperse Blue 291, ^1H (ppm) (WATANABE et al., 2002)	Atribuição, Sinal, J(Hz)	^1H , Disperse Blue 291, ^1H (ppm), Numeração correspondente	Atribuição, Sinal
1.23	6H (2x CH_3), t, $J= 6.8$ Hz	1.06 (1)	6H (2x CH_3), t,
2.51	3H (COCH_3), s	2.28 (2)	3H (COCH_3), s
3.57	4H (2x CH_2), q $J= 6.8$ Hz	3.45 (3)	4H (2x CH_2), q
3.82	3H (OCH_3), s	3.83 (4)	3H (OCH_3), s
7.18	1H (ArH), s	7.21 (5)	1H (ArH), s
7.92	1H (ArH), s	7.93 (6)	1H (ArH), s
8.68	1H (ArH), d, $J= 1.7$ Hz	8.32 (7)	1H (ArH), s,
8.70	1H (ArH), d, $J= 1.7$ Hz	8.74 (8)	1H (ArH), s,
9.25	1H (CONH), largo	9.32 (9)	1H (CONH), largo

Solvente utilizado na literatura: $\text{DMSO}-d_6$

triplete, **t**; duplete, **d**; singleto, **s**

Figura 17: Espectro de ^1H RMN do pico 1 obtido em um equipamento de 300 MHz em $\text{DMSO}-d_6$, como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos.

Tabela 6: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do Pico 1 em DMSO- d_6 .

Pico 1, ^1H (ppm), Numeração correspondente	Atribuição, Sinal
1.07 (1)	3H (CH_3), s (largo)
2.10 (2)	3H (COCH_3), s
3.23 (3)	2H (CH_2), s (largo)
3.87 (4)	3H (OCH_3), s
7.06 (5)	1H (ArH)
7.17 (6)	1H (ArH)
7.38 (7)	1H (ArH)
7.61 (8)	1H (ArH)
8.73 (9)	1H (OH), s
9.34 (10)	1H (NH), s
9.95 (11)	1H (CONH), s

triplete, **t**; duplete, **d**; singleto, **s**

Figura 18: Espectro de ^1H RMN do pico 2 obtido em um equipamento de 300MHz em $\text{DMSO}-d_6$, como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos.

Tabela 7: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do Pico 2 em $\text{DMSO}-d_6$.

2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol (PBTA não clorado-7), ^1H (ppm) (WATANABE et al., 2002)	Atribuição, Sinal, J(Hz)	Pico2, ^1H (ppm), Numeração correspondente	Atribuição, Sinal
1.13	6H (2x CH_3), t, $J = 7.1$ Hz	1.15 (1)	6H (2x CH_3), t, $J = 6.9$ Hz
2.26	3H (COCH_3), s	1.99 (2)	3H (COCH_3), s
3.29	4H (2x CH_2), q $J = 7.1$ Hz	3.22 (3)	4H (2x CH_2), q $J = 6.9$ Hz
3.96	3H (OCH_3), s	3.86 (4)	3H (OCH_3), s
3.98	2H (NH_2), br	8.47 (5)	2H (NH_2), s (largo)
6.90	1H (ArH), d $J = 1.8$ Hz	7.37 (6)	1H (ArH), s,
7.15	1H (ArH), d, $J = 1.8$ Hz	7.41 (7)	1H (ArH), s
7.74	1H (ArH), s,	7.46 (8)	1H (ArH), s,
8.26	1H (ArH), s	7.61 (9)	1H (ArH), s
11.06	1H (CONH), br	9.94 (10)	1H (CONH), s (largo)

triplete, t; dubleto, d; singleto, s

Figura 19: Espectro de ^1H RMN do pico 3 obtido em um equipamento de 300MHz em $\text{DMSO-}d_6$, como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos.

Tabela 8: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do Pico 3 em $\text{DMSO-}d_6$.

Pico 3, δ^{H} (ppm), Numeração correspondente	Atribuição, Sinal, J(Hz)
1.07 (1)	6H (2x CH_3), t, $J = 6.9$ Hz
2.10 (2)	3H(COCH_3)
3.44 (3)	4H (2x CH_2), largo 3H (OCH_3) escondido
5.01 (4)	2H (ArH), s
5.75 (5)	1H (ArH)
5.94 (6)	1H (ArH), s
8.34 (7)	1H (CONH), s, largo
8.55 (8)	2H (NH_2), s (largo)

triplete, **t**; dubleto, **d**; singleto, **s**

Figura 20: Espectro de ^1H RMN do Pico 4 obtido em um equipamento de 300 MHz em $\text{DMSO}-d_6$, como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos.

Tabela 9: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do Pico 4 em $\text{DMSO-}d_6$.

Pico 4, ^1H (ppm), Numeração correspondente	Atribuição, Sinal
1.07 (1)	6H (2x CH_3), t, $J= 6.12$ Hz
1.90 (2)	3H (COCH_3), s
3.24 (3)	4H (2x CH_2), m
3.79 (4)	3H (OCH_3), s
5.69 (5)	1H (ArH), s,
6.03 (6)	1H (ArH), s
6.47 (7)	1H (OH), s
7.04 (8)	1H (ArH), s
8.34 (9)	1H (ArH), s
8.55 (10)	1H (NH), s
9.35 (11)	1H (CONH), s

tripeto, **t**; dubleto, **d**; singleto, **s**; multiplete, **m**

Figura 21: Estruturas sugeridas para os picos 1 e 4 e picos 2 e 3 baseadas na proposta de tautomerismo.

Os espectros de absorvância, de massas e de 1H RMN obtidos para os quatro produtos isolados após redução do corante DB 291 com ditionito de sódio nos permitem concluir que tais produtos sejam 2-fenilbenzotriazóis não clorados (dois pares de tautômeros de não-CIPBTAs), sendo que os espectros de absorvância se assemelham aos obtidos por Watanabe *et al.*(2006) para quatro PBTAs não clorados estudados por eles (PBTA não clorado 2, -3, -4 e -7). A **tabela 10** resume as estruturas propostas e alguns dados obtidos para os produtos isolados no presente trabalho.

Tabela 10: Estruturas propostas e dados obtidos para os PBTAs não clorados.

Estrutura Química	Peso Molecular	UV (λ)	Nome Químico
<p>Pico 1</p>	464 Da	$\lambda_{\text{máx1.}}$: 368 nm $\lambda_{\text{máx2.}}$: 230 nm $\epsilon_{250 \text{ nm}}$ = 6977 M ⁻¹ cm ⁻¹	2-[2-(acetilamino)-4-(diethylamino)-5-metoxifenil]-6-hidroxilamino-4-bromo-2H-benzotriazol
<p>Pico 2</p>	448 Da	$\lambda_{\text{máx1.}}$: 368 nm $\lambda_{\text{máx2.}}$: 230 nm $\epsilon_{250 \text{ nm}}$ = 23767 M ⁻¹ cm ⁻¹	2-[2-(acetilamino)-4-(diethylamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol (WATANABE et al., 2002)
<p>Pico 3</p>	448 Da	$\lambda_{\text{máx1.}}$: 287 nm $\lambda_{\text{máx2.}}$: 217 nm $\epsilon_{250 \text{ nm}}$ = 17937 M ⁻¹ cm ⁻¹	Isômero do produto 2
<p>Pico 4</p>	464 Da	$\lambda_{\text{máx1.}}$: 239 nm $\lambda_{\text{máx2.}}$: 389 nm $\epsilon_{250 \text{ nm}}$ = 11628 M ⁻¹ cm ⁻¹	Isômero do produto 1

Com base na informação de que 2-fenilbenzotriazóis clorados são mais mutagênicos para linhagens de *S.typhimurium* (com fração S9) que seus congêneres não clorados (WATANABE *et. al.*, 2006) resolvemos sintetizar o produto clorado a partir do Pico 2. A **Figura 22** mostra o cromatograma obtido após o processo de cloração do Pico 2. Ao selecionarmos a relação m/z do íon $[M=H]^+$ esperado para o pico 2 adicionado de um átomo de cloro ($m/z=483$), observamos o aparecimento de um pico. A **Figura 23** mostra o espectro de massas do pico selecionado confirmando a formação do pico 2 clorado. A massa selecionada corresponde à estrutura com isótopos ^{81}Br e ^{35}Cl . A ocorrência natural dos isótopos do cloro é ^{35}Cl (75,77%) e ^{37}Cl (24,23%). Com a presença dos átomos Cl e Br na molécula, esperávamos observar no espectro um íon principal com m/z 483 ($^{81}\text{Br} + ^{35}\text{Cl}$ e $^{79}\text{Br} + ^{37}\text{Cl}$), seguido por um outro íon com m/z 481 ($^{79}\text{Br} + ^{35}\text{Cl}$) com intensidade um pouco menor. Um íon com m/z 485 ($^{81}\text{Br} + ^{37}\text{Cl}$) também seria esperado (com intensidade bem menor que as anteriores). Tal distribuição isotópica foi observada no espectro de massas do pico selecionado na **Figura 22** (espectro de massas apresentado na **Figura 23**), indicando a adição do átomo de cloro à molécula.

Figura 22: Cromatograma obtido após cloração do pico 2 (HPLC/ESI/MS) conforme descrito nos itens **3.6** e **3.10**. Foi selecionado o íon com m/z 483.

Figura 23: Espectro de massa do produto obtido após reação do pico 2, como descrito no item 3.10.

O corante C.I. Disperse Blue 291 é mutagênico para diferentes linhagens de *S.typhimurium* na presença de fração S9, principalmente para as linhagens que expressam níveis aumentados de nitrorredutase e/ou o-acetiltransferase (UMBUZEIRO *et al.* 2005 a). Resolvemos nesta etapa do trabalho, verificar se algum PBTA não clorado do DB 291 poderia ser formado a partir da redução enzimática do corante, utilizando nitrorredutase de *E.coli* em incubações *in vitro*, como descrito no item 3.11. Utilizamos PBTAs não clorados como padrões nas análises por HPLC/ESI/MS para investigarmos sua formação após redução enzimática do corante. Ao selecionarmos o íon com m/z 449 nos cromatogramas obtidos, observamos eluição de um produto da redução enzimática do corante com o tempo de retenção igual ao do PBTA não clorado correspondente ao Pico 3 (**Figura 24**). O espectro de massas do pico em 27 minutos resultante da incubação do corante com a enzima nitrorredutase está ilustrado na **Figura 25 A**. O espectro de massas do pico 3 está ilustrado na **Figura 25 B**.

Figura 24: **A)** Cromatograma obtido por HPLC/ESI/MS dos produtos da incubação do corante C.I. Disperse Blue com a enzima nitrorredutase (Seleção do íon em m/z 449). **(B)** Cromatograma do padrão do pico 3 (Seleção de m/z 449).

Figura 25: Espectro de massas obtido por HPLC/ESI/MS de: **A)** produtos resultantes da incubação do corante com a enzima nitrorredutase (pico selecionado em 27 minutos). **B)** Espectro de massa do Pico 3 padrão.

A formação endógena de PBTAs não clorados ainda não foi descrita na literatura. Nossos dados apontam para a possível ocorrência dessa via de bioativação do corante, o que precisa ser melhor investigado.

Cada um dos produtos reduzidos obtido foi acetilado conforme método descrito no item 3.8. os cromatogramas e espectros de massas dos produtos da acetilação estão respectivamente ilustrados nas **Figuras 26 e 27**. Observamos o aparecimento de produtos com massas correspondentes à adição de grupos acetil às moléculas reduzidas.

Os produtos acetilados foram incubados com dGuo em diferentes condições de pH, conforme descrito no item 3.8, porém somente a incubação em pH 9 gerou possíveis adutos (presentes na incubação completa e ausentes no controle). Os cromatogramas dos produtos das incubações com dGuo estão apresentados nas **Figuras 28 e 29**. O espectro de massas dos picos selecionados está apresentado na **Figura 30**. Não observamos a perda de um fragmento em 116 Da, o que corresponderia ao açúcar do nucleosídeo e facilitaria a identificação dos produtos como adutos dGuo-PBTA não clorado. O espectro também indica a perda do átomo de bromo na molécula, uma vez que não observamos mais sua distribuição isotópica. Apenas com o espectro de massas obtido não é possível propor estruturas para os possíveis adutos gerados. A formação de adutos dGuo-PBTAs e dGuo-PBTAs não clorados precisa ser melhor investigada em novas incubações *in vitro*, inclusive na presença de sistemas enzimáticos, como por exemplo HRP/H₂O₂.

Figura 26: Cromatogramas dos picos reduzidos acetilados obtidos por HPLC/ESI/MS segundo método descrito no item 3.8. As figuras A, B, C e D ilustram os íons moleculares selecionados dos picos acetilados e, desta forma, correspondem ao pico 1 acetilado, pico 2 acetilado, pico 3 acetilado e pico 4 acetilado, respectivamente.

Figura 27: Espectros de massas dos picos 1, 2, 3 e 4 acetilados segundo o método descrito no item 3.8.

Figura 28: Cromatogramas dos picos acetilados incubados com dGuo. As figuras A, B, C, D, E, F e G correspondem à seleção de m/z 632 e correspondem respectivamente à dGuo (controle), pico 2 + dGuo, pico 3 + dGuo, pico 4 + dGuo, pico 2 sem dGuo, pico 3 sem dGuo e pico 4 sem dGuo, respectivamente. Os produtos que eluíram em 48 minutos podem ser produtos adutos dGuo-corante reduzido e sua massa corresponde a 632.

Figura 29: Cromatogramas dos picos acetilados incubados com dGuo. As figuras A, B, C, D, E, F e G correspondem à seleção de m/z 683 e correspondem respectivamente à dGuo (controle), pico 2 + dGuo, pico 3 + dGuo, pico 4 + dGuo, pico 2 sem dGuo, pico 3 sem dGuo e pico 4 sem dGuo, respectivamente. Os produtos que eluem em 48 minutos são possíveis adutos dGuo-corante reduzido com m/z 683.

Figura 30: Espectro de massas dos produtos resultantes da incubação dos picos 2, 3 e 4 com dGuo. Os íons moleculares em m/z 683 e 632 podem ser correspondentes à adição de uma molécula do corante a uma molécula de dGuo. Como não observamos a perda do açúcar nos espectros, a ligação pode envolver a desoxirribose. Acreditamos em co-eluição de dois produtos.

Os dados que serão mencionados nesta seção não estão inclusos como resultados deste trabalho, pois foram abordagens que realizamos anteriormente e paralelamente ao estudo de redução do corante, necessitando mais base experimental. Dessa forma, o conteúdo aqui mencionado será apenas textual.

Com o propósito de verificar o nível de estresse oxidativo gerado pelo corante CI Disperse Blue 291, realizamos medidas de 8-oxodGuo em fígado de ratos tratados com o corante, pois danos oxidativos poderiam ser gerados pelo corante durante o processo de biotransformação hepática. Os ratos foram tratados por via intra-gástrica durante 8 e 16 semanas (50 mg/Kg, três vezes por semana, tratamento realizado por Fabriciano Pinheiro, Profa. Silvia Berlanga M. Barros, FCF/USP). Ratos controles receberam água pela mesma via. Quatro semanas após o término do tratamento os ratos foram sacrificados. Após extração e hidrólise do DNA, os níveis de 8-oxodGuo foram analisados por HPLC/detecção eletroquímica.

Os níveis de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo observados no DNA hepático dos ratos tratados com DB 291 foram 6.4 ± 1.0 (8 semanas, N = 4) e 8.3 ± 0.9 (16 semanas, N = 4), sendo inferiores aos níveis encontrados nos respectivos controles: 7.2 ± 1.1 (8 semanas, N = 5) e 12.3 ± 2.7 (16 semanas, N = 3, $p < 0.05$). Ensaios realizados por outros autores em cultura primária de hepatócitos mostram indução de reparo de DNA por diferentes corantes azo e produtos de sua redução (PALUS et al., 1995). Uma possível explicação para os resultados que obtivemos seria a ativação do reparo de 8-oxodGuo nas condições dos tratamentos realizados. Essa hipótese é reforçada em um estudo realizado por Hirano e colaboradores (2003) que investigaram o papel de espécies reativas de oxigênio e geração de 8-oxodGuo na hepatocarcinogenicidade de ratos tratados com amino-azo corantes, em particular 3'-metil-4- (3'-MeDAB). Ogg1 é uma importante enzima de reparo de 8-oxodGuo localizada principalmente na mitocôndria, tendo somente uma isoforma localizada no núcleo. Ao analisar a expressão de mOgg1 em fígado de ratos tratados com o corante, foi verificado alto nível de uma nova isoforma conhecida como mOgg1-32, também capaz de reparar o DNA nuclear. Os autores sugerem ativação de reparo de 8-oxodGuo mediada por amino-azo corantes envolvendo a proteína mOgg1-32.

Investigamos também a citotoxicidade do corante C.I. DB 291 e da mistura dos quatro PBTAs não clorados isolados às células de carcinoma hepatocelular (HepG2). Foram utilizadas as concentrações de 0,5 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM do corante e da mistura de PBTAs não clorados. Comparamos a toxicidade entre células HepG2 cultivadas em meio sem e com propriedades indutoras de isoformas de CYP450 (meio DME e meio de Earle modificado, respectivamente). Observamos comportamentos diferentes entre as células que foram cultivadas em meios diferentes. Enquanto que no meio DME não observamos diferença de sobrevivência das células em relação ao controle nas várias concentrações testadas, no meio de Earle observamos uma pequena indução da proliferação celular na concentração de 1 μM do corante ($p=0,08$) e citotoxicidade na concentração de 10 μM do corante ($p=0,02$). Com os produtos de redução observamos citotoxicidade nas concentrações de 0,5 μM ($p=0,03$) e 10 μM ($p=0,04$). Apesar da necessidade de realizar mais estudos para avaliar os efeitos do corante e seus produtos reduzidos nas células, podemos prever que a biotransformação do corante e seus produtos de redução via CYP450 parece ser importante para a indução de efeitos a nível celular.

Realizamos também oxidações do corante DB 291 para verificar se seus produtos de oxidação seriam capazes de interagir com a dGuo. Utilizamos o reagente de Fenton (um potente sistema oxidante) que consiste de Fe^{2+} e H_2O_2 . Após oxidação completa do corante (perda da coloração) incubamos a amostra com dGuo. Análises foram realizadas por HPLC/UV/ESI/MS e não observamos a formação de produtos que pudessem ser considerados adutos dGuo-corante oxidado.

Este trabalho abriu para o grupo a possibilidade de investigar vias pelas quais produtos de redução de dinitrofenilazo corantes podem lesar o DNA. Uma vez que agora conhecemos os métodos para síntese de PBTAs não clorados e PBTAs do C.I. Disperse Blue 291, poderemos realizar incubações *in vitro* desses compostos com desoxirribonucleosídeos e/ou DNA na presença de sistemas enzimáticos (peroxidases, CYP450, o-acetiltransferases) para investigação da formação de adutos. Alterações celulares induzidas pelo corante C.I. DB 291 e por seus produtos (PBTAs não clorados e PBTAs) ainda

não foram investigadas, havendo também essa possibilidade. Além disso, a possível formação enzimática de um PBTA não clorado a partir do corante DB 291 aponta para uma nova via de bioativação dessa classe de corantes. A formação de PBTAs não clorados em bactérias que super-expressam nitrorredutases e em células de mamíferos em cultura poderá ser investigada utilizando-se dos padrões que sintetizamos.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- Foram isolados quatro produtos da redução do corante com ditionito de sódio e seus espectros de absorbância mostram que os produtos reduzidos não apresentam a banda de absorção em 613 nm, correspondente à ligação azo.
- Espectros de massas e ^1H RMN mostram que os produtos são dois pares de tautômeros com m/z 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- Os produtos foram caracterizados como 2-fenilbenzotriazóis não clorados, sendo nomeados quimicamente como: 2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-hidroxilamino-4-bromo-2H-benzotriazol e 2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol.
- Os quatro produtos reduzidos foram acetilados com anidrido acético/piridina e espectros de massas mostram a formação de produtos com massas 506 Da e 490 Da.
- Os produtos acetilados foram incubados com 2'-desoxiguanosina e as análises por HPLC/ESI/MS revelaram a formação de dois produtos com m/z 632 e m/z 683. Suas estruturas não puderam ser elucidadas com os espectros obtidos.
- Obtivemos também o produto 2-fenilbenzotriazol clorado 2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA) a partir da reação do Pico 2 com hipoclorito de sódio.

- A incubação do corante C.I. DB 291 com nitrorredutase/NADH levou à perda de grupos cromóforos (perda de cor). Análises por HPLC/ESI/MS indicam a formação de um não-CIPBTA (m/z 449) a partir da redução enzimática do corante. Uma vez que não-CIPBTAs são mais mutagênicos para linhagens de *S. typhimurium* (com fração S9) que seus dinitrofenilazo corantes precursores, a conversão enzimática do corante para não-CIPBTAs pode ser uma via importante para sua bioativação.

6. BIBLIOGRAFIAS

6. BIBLIOGRAFIA

ANDREW, A.S.; SCHMED, A.R.; HEAMEY, J.A.; KARAGAS, M.R. Bladder cancer risk and personal hair dye use. *International Journal of Cancer*, v.109, p.581-586, 2004.

AL-BUHEISSI, S.Z.; HEWER, C.A.; KUMAR, V.; BRYAN, R.L.; HUDSON, D.L.; PATEL, H.R.; NATHAN, S.; MILLER, R.A.; PHILLIPS, D.H. The expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in human prostate and in Prostate Epithelial Cells (PECs) derived from primary cultures. *Prostate*, v.66, p.876-885, 2006.

ALDERSON, M. Cancer mortality in male hairdressers. *Journal of Epidemiology and Community Health*, v.34, p.182-185, 1980.

ARLT, V.M., SCHMEISER, H.H., OSBORNE, M.R., KAWANISHI, M., KANNO, t., YAGI, T., PHILLIPS, D.H., TAKAMURA-ENYA, T. Identification of three major DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in rat lung at the C8 and N2 position of guanine and at the N6 position of adenine. *Int. J. Cancer*, v.118, p.2139-2146, 2006.

ARLT, V.M. 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. *Mutagenesis* v.20, p.399-410, 2005.

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

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

BAER-DUBOWSKA, W. Tobacco smoking related DNA and protein adducts and risk of degenerative diseases. *Przegl Lek.* v.63, p.932-5, 2006.

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

BELAND, F.A., CHURCHWELL, M.I. TUNGELN, L.S.V., CHEN, S., FU, P.P., CULP, S.J., SCHOKET, B., GYORFFY, E., MINÁROVITS, J. POIRIER, M.C. BOWMAN, E.D. WESTON, A., DOERGE, D.R. High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.*, v.18, p.1306-1315, 2005.

BIELER, C.A., CORNELIUS, M.G., STIBOROVA, M., ARLT, V.M., WIESSLER, M. PHILLIPS, D.H., SCHMEISER, H.H. Formation and persistence of DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in target and non-target organs after intratracheal instillation in rats. *Carcinogenesis* v.28, p.1117-1121, 2007.

BRINK, A., LUTZ, U., VÖLKEL, W., LUTZ, W.K. Simultaneous determination of O6-methyl-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, and 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine in DNA using on-line sample preparation by HPLC column switching coupled to ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v.830, p.255–261, 2006.

BROYDE, S., GRAD, R., SHAPIRO, R., HINGERTY, B.E. A Molecular Mechanics and Dynamics Study of the Minor Adduct between DNA and the Carcinogen 2-(Acetylaminofluorene (dG-N2-AAF). *Chem. Res. Toxicol.* v.10, p.1123-1132, 1997.

BRUCE, N.C.; SYMONS, Z.C. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Natural Product Reports*, v.23, p.845-850, 2006.

CERNIGLIA, C.E.; RAFII, F. Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. *Environmental Health Perspectives*, v.103, p.17-19, 1995.

CHUNG, K.-T.; CHEN, S.-C.; CLAXTON, L.D. Review of the *Salmonella typhimurium* mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes. *Mutation Research*, v.612, n.1, p.58-76, 2006.

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

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

CLAXTON, L.D., HOUK, V.S., HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* v.410, p.237-43, 1998.

CUI, X.-S., ERIKSSON, L.C., MÖLLER, L. Formation and persistence of DNA adducts during and after a long-term administration of 2-nitrofluorene. *Mutation Research* v.442, p.9-18, 1999.

CZENE, K.; TIKKAJA, S.; HEMMINKI, K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. *International Journal of Cancer*, v.105, p.108-112, 2003.

DOMINGUEZ, M.G.; CASTELAO, J.E.; YUAN, J.M.; YU, M.C.; ROSS, R.K. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *International Journal of Cancer*, v.91, p.575-579, 2001.

DUPRET, J.-M.; RODRIGUES-LIMA, F.; DAIROU, J.; DIAZ, C.L.; RUBIO, M.C.; SIM, E.; SPAINK, H.P. Cloning, functional expression and characterization of *Mesorhizobium loti* arylamine N-acetyltransferases: rhizobial symbiosis supplies leguminous plants with the xenobiotic N-acetylation pathway. *Molecular Microbiology*, v.60, p.505-512, 2006.

EDLER, M., JAKUBOWSKI, N. e LINSCHIED, M. Quantitative determination of melphalan DNA adducts using HPLC – inductively coupled mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* v.41, p.507-516, 2006.

ERIKSSON, H.L., ZEIZIG, M., EKSTRÖM, L-G., MÖLLER, L. ³²P-postlabeling of DNA adducts arising from complex mixtures: HPLC versus TLC separation applied to adducts from petroleum products. *Arch Toxicol* v.78 p.174–181, 2003.

ESAKA, Y., INAGAKI, S., GOTO, M. Separation procedures capable of revealing DNA adducts. *Journal of Chromatography B*, v.797, p.321–329, 1993.

FARMER, P.B. DNA and protein adducts as markers of genotoxicity *Toxicology Letters* v.149, p.3–9, 2004.

FUJITA, S. e PEISACH, J. The stimulation of microsomal azoreduction by flavins. *Biochim Biophys Acta*.v.719,p.178-89, 1982.

FUJITA, S. OKADA, Y., PEISACH, J. Inhibition of azoreductase activity by antibodies against cytochromes P-450 and P-448 *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.102, p.492-498, 1981.

GEORGIARDIS, P.; TOPINKA, J.; STOIKIDOU, M.; KAILA, S.; GIOKA, M.K.; SRAM, R.; AUTRUP, H.; KYRTOPOULUS, S.A. Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis*, v.22, p.1447-1457, 2001.

GAYLOR, D., KADLUBAR, F.F., BELAND, F.A. Application of Biomarkers to Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* v.98, p.139-141, 1992.

GUENGERICH, F.P. N-hydroxylamines. *Drug. Metab. Rev.* v.34, p.607-23, 2002.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicina. 4^a ed. OXFORD, 2007.

HASHIMOTO, Y., WATANABE, H.K., DEGAWA, M. Mutagenicity of 4-aminoazobenzene, N-hydroxy-4-aminoazobenzene, 4-nitrosoazobenzene, 4-nitroazobenzene, and their ring methoxylated derivatives on Salmonella. *Gann*, v.72, p.921-9, 1981.

HE, M.-C.; SUN, Y.; LI, X.-R.; YANG, Z.-F. Distribution patterns of nitrobenzenes and polychlorinated biphenyls in water, suspended particulate matter and sediment from mid- and down-stream of the Yellow River (China). *Chemosphere*, v.65, p.365–374, 2006.

HEIN, D.W. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research* v.506–507 p.65–77, 2002.

HIRANO, T., KUDO, H., DOI, Y., NISHINO, T., FUJIMOTO, S., TSURUDOME, Y., OOTSUYAMA, Y., KASAI, H. Detection of a smaller, 32-kDa 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene-treated mouse liver. *Cancer Sci.*, v.95, p.118-22, 2004.

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

HUMPHREYS, G., KADLUBAR, F.F., GUENGERICH, P. Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: Evidence for initial adduct formation at the N7 position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.89, p.8278-8282, 1992.

International Agency for Research on Cancer. **Some inorganic substances, chlorinated hydrocarbons, aromatic amines, *n*-nitroso compounds and natural products.** Lyon: IARC, 1972. p80.

International Agency for Research on Cancer. **Overall evaluations of carcinogenicity:** an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Lyon: IARC, 1987. p.123 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl.7).

International Agency for Research on Cancer. **Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines.** Lyon: IARC, 1993. p.43. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.57).

ITO, N.; HASEGAWA, R.; SANO, M.; TAMANO, S.; ESUMI, H.; TAKAYAMA, S.; SUGIMURA, T. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, v.12, p.1503-1506, 1991.

KADLUBAR, F.F., GORLEWSKA-ROBERTS, K., GREEN, B., FARES, M., AMBROSONE, C.B. Carcinogen–DNA Adducts in Human Breast Epithelial Cells *Environmental and Molecular Carcinogenesis* v.39, p.184-192, 2002.

KADLUBAR, F.F., BELAND, F. Formation and Persistence of Arylamine DNA Adducts *In Vivo*. *Environmental Health Perspectives* v.62, p.19-30, 1985.

KAWANISHI, M.; ENYA, T.; SUSUKI, H.; TAKEBE, H.; MATSUI, S.; YAGI, T. Mutagenic specificity of a derivative of 3-Nitrobenzanthrone in the *supF* shuttle vector plasmids. *Chemical Research in Toxicology*, v.11, p.1468-1473, 1998.

KIM, D.; GUENGERICH, F.P. Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.45, p.27–49, 2005.

KOJIMA, M., DEGAWA, M., HASHIMOTO, Y , TADA, M. The Carcinogenicity of Methoxyl Derivatives of 4-Aminoazobenzene: Correlation between DNA Adducts and Genotoxicity. *Environ Health Perspect* v.102, p.191-194, 1994.

KUSANRAN, W.R., WAKABAYASHI, K., OGURI, A., TEPSUWAN, A., NAGAO, M., SUGIMURA, T. Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. *Mutat. Res.* v.325, p.99-104, 1994.

LA VECCHIA, C.; TAVANI, A. Epidemiological evidence on hair dyes and the risk of cancer in humans. *European Journal of Cancer Prevention*, v.4, p.31-43, 1995.

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

LIU, X., LOVELL, M.A., LYNN, B.C. Development of a method for quantification of acrolein-deoxyguanosine adducts in DNA using isotope dilution-capillary LC/MS/MS and its application to human brain tissue. *Anal. Chem.* v.77, p.5982-5989, 2005.

MAKENA, P.S.; CHUNG, K.-T. Evidence that 4-aminobiphenyl, benzidine, and benzidine congeners produce genotoxicity through reactive oxygen species. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.48, n.5, p.404-413, 2007.

MATTAMMAL, M.B., LAKSHMI, V.M. ZENZER, T.V., DAVIS, B.B. Metabolism of aromatic and heterocyclic amine bladder carcinogens: bioanalytical considerations. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis.* v.8, p.151-158, 1990.

MARUOKA, S., YAMANAKA, S. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* tester strains of XAD-2-ether extract, recovered from Katsura River water in Kyoto City, and its fractions. *Mutat. Res.* v.102, p.13-26, 1982.

MASUDA, S., DEGUCHI, Y., MASUDA, Y., WATANABE, T., NUKAYA, H., TERAOKA, Y., TAKAMURA, T., WAKABAYASHI, K., KINAE, N. Genotoxicity of 2-[2-(acetyl-amino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research* v.560, p.33–40, 2004.

MATSUOKA, A., TADA, A., TERAOKA, 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. *Mutation Research* v.493, p.75-85, 2001.

MCGRATH, M., MICHAUD, D., De VIVO, I. Polymorphisms in *GSTT1*, *GSTM1*, *NAT1* and *NAT2* genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer* v.6, p.239, 2005.

MEANS, J.C., OLSEN, P.D., SCHOFFERS, E. Development of an isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection method for DNA adducts of selected aromatic amines. *J Am Soc Mass Spectrum* v.14, p.1057–1066, 2003.

MILLER, J.A.; DELCLOS, K.B.; TARPLEY, W.G.; MILLER, E.C. 4-Aminoazobenzene and N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzene as equipotent hepatic carcinogens in male C57BL/6 x C3H/He F1 mice and characterization of N-(Deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoazobenzene as the major persistent hepatic DNA-bound dye in these mice. *Cancer Research*, v.44, p.2540-2550, 1984.

MILLER, E.C. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: presidential address. *Cancer Research*, v.38, p.1479-1496, 1978..

MÖLLER, L.; NAGY, E.; ADACHI, S.; ENYA, T.T.; ZEISIG, M. DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis*, v.22, p.135-145, 2007.

MÖLLER, L.; NAGY, E.; ZEISIG, M.; KAWAMURA, K.; HISAMATSU, Y.; SUGETA, A.; ADACHI, S. DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Carcinogenesis*, v.26, p.1821-1828, 2005.

MÖLLER, P., WALLIN, H. Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene. *Mutation Research* v.462,p.13–30, 2000.

MORI, H.; MORI, Y.; SUGIE, S.; YOSHIMI, N.; TAKAHASHI, M.; NI-I, H.; YAMAZAKI, H.; TOYOSHI, K.; WILLIAMS, G.M. Genotoxicity of a variety of azobenzene and aminoazobenzene compounds in the hepatocyte/DNA repair test and the *salmonella*/mutagenicity test. *Cancer Research*, v.46, p.1654-1658, 1986.

NEHER, D.A., STÜRZENBAUM, S.R. Extra-long PCR, an identifier of DNA adducts in single nematodes (*Caenorhabditis elegans*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.144, p.279–285, 2006.

NESNOW, S., BERGMAN, H., BRYANT, B.J. HELTON, S., RICHARD, A. A CASE-SAR study of mammalian hepatic azoreduction. *J Toxicol Environ Health*. v.24, p.499-513, 1988.

NIU, C.S., LI, J., DOYLE, T.W., CHEN, S.H. Synthesis of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AP). *Tetrahedron*, v.54, p.6311-6318, 1998.

NOHYEK, G.J.; FAUTZ, R.; KIEFFER, F.B.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology*, v.42, p.517-543, 2004.

NUKAYA, H., SHIOZAWA, T., TADA, A., TERAOKA, Y., OHE, T., WATANABE, T., ASANOMA, M., SAWANISHI, H., KATSUBARA, 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. *Mutation Research* v.492, p.73-80, 2001.

NUKAYA, H., YAMASHITA, J., TSUJI, K., TERAOKA, Y., OHE, T., SAWANISHI, H., KATSUHARA, T., KIYOKAWA, K., TEZUKA, M., OGURI, A., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Isolation and Chemical-Structural Determination of a Novel Aromatic Amine Mutagen in Water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chemical Research in toxicology*. v.10, p.1061-1066, 1998.

OGURI, A., SHIOZAWA, T., TERAOKA, Y., NUKAYA, H., YAMASHITA, J., OHE, T., SAWANISHI, H., KATSUHARA, T., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Identification of a 2-Phenylbenzotriazole (PBTA)-Type Mutagen, PBTA-2, in Water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem. Res. Toxicol.* v.11, p.1195-1200, 1998.

OHE, T., WATANABE, T., WAKABAYASHI, K., Mutagens in surface waters: a Review. *Mutation Research* v.567, p.109-149, 2004.

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

OLIVEIRA, D.P., CARNEIRO, P.A., RECH, C.M., ZANONI, M.V., CLAXTON, L.D., Mutagenic compounds generated from the chlorination of disperse azo-dyes and their presence in drinking water. *Environ. Sci. Technol.* v.40, p.6682-9, 2006.

PALUS, J., SCHWARZ, L., FRANK, C., ANDRAE, U. DNA repair synthesis induced by azo dyes in primary rat hepatocyte cultures using the bromodeoxyuridine density-shift method. *Int J Occup Med Environ Health.*, v.8, p.123-30.

PLATT, K.L., DEGENHARTDT, C., GRUPE, S., FRANK, H., SEIDEL, A. Microsomal activation of dibenzo[def,mno]chrysene (anthanthrene), a hexacyclic aromatic hydrocarbon without a bay region, to mutagenic metabolites. *Chem. Res. Toxicol.*, v.15, p.332-342, 2002.

POIRIER, M.C. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature* v.4, p.630-637, 2004.

POIRIER, M.C., FULLERTON, N.F., KINOCHI, T., SMITH, B.A., BELAND, F.A. Comparison between DNA adduct formation and tumorigenesis in livers and bladders of mice chronically fed 2-acetylaminofluorence *Carcinogenesis* v.12, p.895-900, 1991.

RAFII, F.; CERNIGLIA, C.E. Comparison of the azoreductase and nitroreductase from *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.6, p.1731-1734, 1993.

RANDERATH, E., AGRAWAL, H.P., WEAVER, J.A., BORDELON, C.B.,
RANDERATH, K. ^{32}P -postlabeling analysis of DNA adducts persisting for up to
42 weeks in the skin, epidermis and dermis of mice treated topically with 7,12-
dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* v.6, p.1117-26, 1985.

RANDERATH, K., REDDY, M.V., GUPTA, R. ^{32}P -Labeling test for DNA
damage *Proc. Natl Acad. Sci. USA* v.78, p.6126-6129, 1981.

RICIKI, E.M., LUO, W., FAN, W., ZHAO, L.P. ZARBL, H., VOUIROS, P.
Quantification of N-(Deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl adducts in human
lymphoblastoid TK6 cells dosed with N-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl and their
relationship to mutation, toxicity, and gene expression profiling. *Anal. Chem.*
v.78, p.6422-6432, 2006.

ROTHMAN, N., BHATNAGAR, V.K., HAYES, R.B., ZENSER, T.V., KASHYAP,
S.K., BUTLER, M.A., BELL, D.A., LAKSHMI, V., JAEGER, M., KASYAP, R.,
HIRVONEN, A., SCHULTE, P.A., DOSEMECIT, M., HSU, F., PARIKH, D.J.,
DAVIS, B.B., TALASKA, G. The impact of interindividual variation in NAT2
activity on benzidine urinary metabolites and urothelial DNA adducts in exposed
workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.93, p.5084-5089, 1996a.

ROTHMAN, N., HAYES, R.B., ZENSER, T.V., DEMARINI, D.M., BI, W.,
HIRVONEN, A., TALASKA, G., BHATNAGAR, V.K., CAPORASO, N.E.,
BROOKS, L.R., LAKSHMI, V.M., FENG, P., KASHYAP, S.K., YOU, X.,
EISCHEN, B.T., KASHYAP, R., SHELTON, M.L., HSU, F.F., JAEGER, M.,
PARIKH, D.J., DAVIS, B.B., YIN, S., BELL, D.A. The Glutathione S-Transferase
M1 (GSTM1) null genotype and benzidine-associated bladder cancer, urine
mutagenicity, and exfoliated urothelial cell DNA adducts. *Cancer Epidemiology,
Biomarkers and Prevention*. v.5, p.979-983, 1996b.

ROTHMAN, N., TALASKA, G., HAYES, R.B., BHATNAGAR, V.K., BELL, D.A., LAKSHIMI, V.M., KASHYAP, S.K., DOSEMECI, M., KASHYAP, R., HSU, F.F., JAEGER, M., HIRVONEN, A., PARIKH, D.J., DAVIS, B.B., ZENZER, T.V.

Acidic urine pH is associated with elevated levels of free urinary benzidine and *N*-acetylbenzidine and urothelial cell DNA adducts in exposed workers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* v.6, p.1039-1042, 1997.

RUNDLE, A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutation Research* v.600, p.23-36, 2006.

SABBIONI, G., BEYERBACH, A., ROTHMAN, N., BHATNAGAR, V.K., KASHYAP, R. Hemoglobin adducts in workers exposed to benzidine and azo dyes. *Carcinogenesis* v.27, p.1600-1606, 2006.

SANTELLA, R.M. Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **8**, 733–739, 1999.

SAYATO, Y., NAKAMURO, K., UENO, H., GOTO, R. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phythalocyanine derivative recovered from municipal river water. *Mutat. Res.* v.300, p.207-13, 1993.

SCHARER, O.D., GILLET, L.C.J. Preparation of C8-amine and acetlyamine adducts of 2'-Deoxyguanosine suitably protected for DNA synthesis. *Organic Letters* v.4, p.4205-4208, 2002.

SCHERER, G.; RIEDEL, K.; ENGL, J.; HAGEDORN, H-W.; TRICKER, A.R. Determination of three carcinogenic aromatic amines in urine of smokers and nonsmokers. *Journal of Analytical Toxicology*, v.30, p.187-195, 2006.

SCHEUERMAN, R.A., TUMELTY, D. The reduction os aromatic nitro groups on solid supports using sodium hydrosulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). *Tetrahedron Letters*, v.41, p.6531-6535, 2000.

SCHMEISER, H.H., HAACK, T., BOCHE, G., KLIEM, C., WIESSLER, M., ALBERT, D. Synthesis, Characterization, and ^{32}P -Postlabeling of *N*-(Deoxyguanosin)-4-aminobiphenyl 3'-Phosphate Adducts. *Chem. Res. Toxicol.* v.17, p.776-784, 2004.

SHAPIRO, R., ELLIS, S., HINGERTY, B.E., BROYDE, S. Effect of Ring Size on Conformations of Aromatic Amine-DNA Adducts: The Aniline-C8 Guanine Adduct Resides in the B-DNA Major Groove. *Chem. Res. Toxicol.* v.11, p.335-341, 1998.

SHIBUTANI, S., KIM, S.Y., SUSUKI, N. ^{32}P -postlabeling DNA damage assays: PAGE, TLC, and HPLC. *Methods Mol. Biol.* v.314, p.307-21, 2006.

SHIOZAWA, T., TADA, A., NUKAYA, H., WATANABE, T., TAKAHASHI, Y., ASANOMA, M., OHE, T., SAWANISHI, H., KATSUHARA, T., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K., TERAOKA, Y. Isolation and Identification of a New 2-Phenylbenzotriazole-Type Mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi, Japan. *Chem. Res. Toxicol.* v.13, p.535-540, 2000.

SHIOZAWA, T., MURAOKA, K., NUKAYA, H., OHE, T., SAWANISHI, H., OGURI, A., WAKABAYASHI, K., SUGIMURA, T., TERAOKA, Y. Chemical Synthesis of a Novel Aromatic Amine Mutagen Isolated from Water of the Nishitakase River in Kyoto and a Possible Route of Its Formation. *Chem. Res. Toxicol.*, v.11, p.375-380, 1998.

SINGH, R., SRAM, R.J., BINKOVA, B., KLINA, I., POPOV, T.A., GEORGIEVA, T., GARTE, S., TAIOLI, E., FARMER, P.B. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutation Research Article in Press*, 2007.

SKIPPER, P.L.; TRUDEL, L.J.; KENSLER, T.W.; GROOPMAN, J.D.; EGNER, P.A.; LIBERMAN, R.G.; WOGAN, G.N.; TANNENBAUM, S.R. DNA adduct formation by 2,6-Dimethyl-, 3,5-Dimethyl-, and 3-ethylaniline *in vivo* in mice. *Chemical Research in Toxicology*, v.19, p.1086-1090, 2006.

SKOV, T.; LYNGE, E. Cancer risk and exposures to carcinogens in hairdressers. *Skin Pharmacology*, v.7, p.94-100, 1994.

STIBOROVA, M., RUPERTOVA, M., AIMOVA, D., RYSLAVA, H., FREI, E. Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats. *Toxicology Article in press*, 2007.

STIBOROVA, M., MARTÍNEK, V., RYDLOVA, H. e FREI, E. Sudan I Is a Potential Carcinogen for Humans: Evidence for Its Metabolic Activation and Detoxication by Human Recombinant Cytochrome P450 1A1 and Liver Microsomes. *Cancer Research* v.62, p.5678-5684, 2002.

STIBOROVA, M., SCHMEISER, H.H. , FREI, E. Prostaglandin H synthase-mediated oxidation and binding to DNA of a detoxication metabolite of carcinogenic Sudan I, 1-(phenylazo)-2,6-dihydroxynaphthalene. *Cancer Letters* v.146, p.53-60, 1999.

STODDART, A.M. e LEVINE, W.G. Azoreductase activity by purified rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochemical Pharmacology*, 43, 2227-2235, 1992.

SUSUKI, H.; ENYA, T.; KAWANISHI, M.; MATSUI, S.; HISAMATSU, Y. An unusual DNA adduct derived from the powerfully mutagenic environmental contaminant 3-Nitrobenzantrone. *Chemical Research in Toxicology*, v.11, p.1460-1467, 1998.

SWAMINATHAN, S., HATCHER, J.F. Identification of N-deoxyguanosin-8-yl)-4-azobiphenyl by (32)P-postlabeling analyses of DNA in human uroepithelial cells exposed to proximate metabolites of the environmental carcinogen 4-aminobiphenyl. *Environ. Mol. Mutagen.* v.39, p.314-22, 2002a.

SWAMINATHAN, S., HATCHER, J.F. Identification of new DNA adducts in human bladder epithelia exposed to the proximate metabolite of 4-minobiphenyl using ³²P-postlabeling method. *Chemico-Biological Interactions* v.139, p.199–213, 2002b.

SYNDERWINE, E.G.; SCHUT, H.A.J. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v.20, p.353–368, 1999.

TADA, M.; KOJIMA, M.; DEGAWA, M.; HASHIMOTO, Y. The carcinogenicity of methoxyl derivatives of 4-aminoazobenzene: correlation between DNA adducts and genotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, v.102, p.191-194, 1994.

TAKAMURA-ENYA, T., ENOMOTO, S., WAKABAYASHI, K. Palladium-Catalyzed Direct *N*-Arylation of Nucleosides, Nucleotides, and Oligonucleotides for Efficient Preparation of dG-N2 Adducts with Carcinogenic Amino-/Nitroarenes. *J. Org. Chem.* v.71, p.5599-5606, 2006.

TURESKY, R.J. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, v.168, p.219–227, 2007.

TURESKY, R.J., MARKOVIC, J., AESCHLIMANN, J-M. Formation and Differential Removal of C-8 and N2-Guanine Adducts of the Food Carcinogen 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in the Liver, Kidney, and Colorectum of the Rat. *Chem. Res. Toxicol.* v.9, p.397-402, 1996.

TRUDEL, L.J., ZAYAS, B., STILLWELL, S.W., WISHNOK, J.S., SKIPPER, P., YU, M.C., TANNENBAUM, S.R., WOGAN, G.N. Detection and uantification of 4-ABP adducts in DNA from bladder cancer patients. *Carcinogenesis* v.28, p.342-349, 2007.

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

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* v.60, p.55–64, 2005a.

UMBUZEIRO, G.A., FREEMAN, H., 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. *Food and Chemical Toxicology* v.43, p.49-56, 2005b.

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

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

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. Disponível em: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/benzidin.html>. Acesso em: 20 abr. 2007.

VERDINA, A. Carcinogen-modified DNA and specific humoral immunity toward carcinogen-DNA adducts. A review. *ANN IST SUPER SANITÀ* v.42, p.189-194, 2006.

VINEIS, P.; PIRASTU, R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes and Control*, v.8, p.346-355, 1997.

WAKABAYASHI, K., OGURI, A., SHIOZAWA, T., TERAQ, Y., NUKAYA, H., YAMASHITA, J., OHE, T., SAWANISHI, H., KATSUHARA, T., SUGIMURA, T. Identification of a 2-Phenylbenzotriazole (PBTA)-Type Mutagen, PBTA-2, in Water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem. Res. Toxicol*, v.11, p.1195-1200, 1998.

WAKABAYASHI, K.; USHIYAMA, H.; TAKAHASHI, M.; NUKAYA, H.; KIM, S.-B.; HIROSE, M.; OCHIAI, M.; SUGIMURA, T.; NAGAO, M. Exposure to heterocyclic amines. *Environmental Health Perspectives*, v.99, p.129-133, 1993.

WATANABE, T., OHBA, H., ASANOMA, M., HASEI, T., TAKAMURA, T., TERAQ, Y., SHIOZAWA, T., HIRAYAMA, T., WAKABAYASHI, K., NUKAYA, H., Isolation and identification of non-chlorinated phenylbenzotriazole (non-CIPBTA)-type mutagens in the Ho River in Shizuoka Prefecture, Japan. *Mutat. Res.* v.609, p.137-45, 2006.

WATANABE, T., SHIOZAWA, T., TAKAHASHI, Y., TAKAHASHI, T., TERAQ, 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* v.17, p.293-9, 2002.

WATANABE, T., NUKAYA, H., TERAQ, 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. *Mutation Research* v.498, p.107-115, 2001.

WATANABE, H.K.; HASHIMOTO, Y.; ABE, I.; SATO, H. Carcinogenicities of 3-methoxy-4-aminoazobenzene, N-hydroxy-3-methoxy-4-aminoazobenzene and related azo dyes in the mouse. *GANN*, v.73, p.136-140, 1982.

WATSON, W.P., MUTTI, A. Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers* v.9, p.211-242, 2004.

WESTWOOD, I., SIM, E e FULLAN, e. Arylamine *N*-acetyltransferases. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* v.3, p.169-184, 2007.

WHITE, P.A., RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation research* v.410, p.223-36, 1998.

WILSON, C., ABOYADE-COLE, A., NEWELL, O., DARLING, REED, S., ORIAKU, E., THOMAS, R. Diallyl sulfide inhibits PhIP induced DNA strand breaks in normal human breast epithelial cells. *Oncol. Rep.* v.17, p.807-11, 2007.

YOUNG, R.H. A brief history of the pathology of the gonads. *Modern Pathology*, v.18, p.S3-S17, 2005.

YU, M.C.; SKIPPER, P.L.; TANNENBAUM, S.R.; CHAN, K.K.; ROSS, R.K. Arylamine exposures and bladder cancer risk. *Mutation Research*, v.506/507, p.21-28, 2002.

ZBAIDA, S., BREWER, C.F., LEVINE, W.G. Hepatic microsomal azoreductase activity. Reactivity of azo dye substrates is determined by their electron densities and redox potentials. *Drug Metabolism and Disposition*. v.22, p.412-418, 1994.

ZBAIDA, S., LEVINE, W.G. Characteristics of two classes of azo dye reductase activity associated with rat liver microsomal cytochrome P450. *Biochem Pharmacol.* v.40, p.2415-23, 1990.

ZENSER, T.V., LAKSHMI, V.M., HSU, F.F., DAVIS, B.B. Metabolism of *N*-acetylbenzidine and initiation of bladder cancer. *Mutation Research* v.506-507, p.29-40, 2002.

ZHU, J., RASHID, A., CLEARLY, K., ABBRUZZESE, J.L., FRIESS, H., TAKAHASHI, S., SHIRAI, T., LI, D. Detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]-pyridine (PhIP)-DNA adducts in human pancreatic tissues. *Biomarkers* v.11, p.319-328, 2007.