

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Comparação da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1,  
Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de  
mutagenicidade com *Salmonella***

Elisa Raquel Anastácio Ferraz

Ribeirão Preto  
2008

## RESUMO

ANASTÁCIO FERRAZ, E. R. **Comparação da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade *Salmonella/microsoma***. 2008. 102f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Os azo corantes representam o maior grupo de corantes utilizados na indústria, principalmente no ramo têxtil. Sabe-se que grande parte desses produtos resiste aos sistemas de tratamento de efluente e assim, cerca de 10-15% dos corantes perdidos durante o processo de tingimento são lançados no efluente e atingem o meio ambiente. Alguns corantes desse grupo têm mostrado ser cancerígenos e mutagênicos para animais e humanos. Essa toxicidade se deve, em parte, à clivagem da ligação azo formando aminas aromáticas potencialmente cancerígenas. Ainda, a ação de sistema de metabolização nos grupamentos substituintes pode alterar a toxicidade destes compostos. Neste trabalho foram testados os azo corantes Disperse Orange 1 (4-(4-nitrofenilazo)difenilamina); pureza 96%; CAS no 2581-69-3), Disperse Red 1 (N-etil-N(2-hidroxietil)-4-(4-nitrofenilazo)anilina; pureza 95%; CAS no. 2872-52-8) e Disperse Red 13 (2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino] etanol; pureza de 95%; CAS no 3180-81-2) usando o ensaio de mutagenicidade com *Samonella*. Foram utilizadas as linhagens tradicionais, TA98 e TA100 e suas respectivas derivadas com superprodução de nitroreductase e O-acetiltransferase, YG1041 e YG1042. Todos os corantes testados mostraram respostas mais altas com a linhagem TA98 em relação a TA100, o que sugere que esses compostos exercem seu efeito mutagênico principalmente por deslocamento do quadro de leitura do DNA. Para os três corantes, a resposta da linhagem YG1041 em relação a sua parental TA98 foi significativamente aumentada, mostrando a importância da nitroreductase e O-acetiltransferase na mutagenicidade desses corantes. Tal fato foi confirmado com as respostas da TA100 em relação a YG1042. O sistema de metabolização exógeno (S9) diminuiu a mutagenicidade de todos os corantes testados. Considerando os resultados obtidos com a linhagem YG1041, o corante Disperse Red 1 é o mais potente, seguido do Disperse Orange 1 e do Disperse Red 13.

Palavras-chave: Disperse Red 1, Disperse Orange 1, Disperse Red 13, azo corantes, ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Corantes têxteis

Até a metade do século XIX, todos os corantes eram derivados de folhas, ramos, raízes, frutos ou flores de várias plantas e de substâncias extraídas de animais e de minerais. O primeiro corante sintético foi descoberto apenas em 1856 na Inglaterra. E a partir daí esse grupo vem cada vez mais tomando espaço no mercado, sendo extensivamente utilizado em diversos setores industriais, principalmente têxtil. Hoje a indústria de corantes dos Estados Unidos é a maior fonte exportadora destes produtos, colocando no mercado aproximadamente 2.000 tipos diferentes de corantes sintéticos. No Brasil a produção industrial atualmente supre 60% da sua demanda doméstica (GUARATINI; ZANONI, 2000; McMULLAN et al., 2001). É importante salientar que desde o ano de 1995, depois do Tratado Norte – Americano de Livre Comércio (NAFTA) e aumento da globalização, muitas das indústrias têxteis dos Estados Unidos têm se mudado para outras regiões do mundo. Essa mudança se deve ao fato do alto custo da mão de obra nesse país, o que leva à transferência dessas indústrias para regiões menos desenvolvidas industrialmente, onde a mão de obra barata e falta de rigor nas regulamentações ambientais resultam num menor custo (MOORE; AUSLEY, 2004). Sendo assim, grande parte dos corantes e pigmentos utilizados pelos Estados Unidos são produzidos em outros países.

A disponibilidade comercial de corantes é enorme e para atender à demanda dos clientes em relação a cores e tons, as empresas têxteis têm à sua disposição mais de 10.000 corantes, o que representa um consumo anual de cerca de  $7 \times 10^5$  tons no mundo (RAJAGURU et al., 1999; GUARATINI; ZANONI, 2000), sendo 26.500 tons somente no Brasil (KUNZ et al., 2002). Além da padronagem e beleza da cor, o consumidor normalmente exige algumas características básicas do produto, por exemplo, boa resistência à luz, lavagem e transpiração, tanto inicialmente quanto após uso prolongado.

Para garantir essas propriedades, as substâncias que conferem coloração à fibra devem apresentar alta afinidade, uniformidade na coloração, resistência aos

agentes desencadeadores do desbotamento e ainda apresentar-se viável economicamente. Daí a importância do processo de tingimento no sucesso comercial dos produtos têxteis (GUARATINI; ZANONI, 2000).

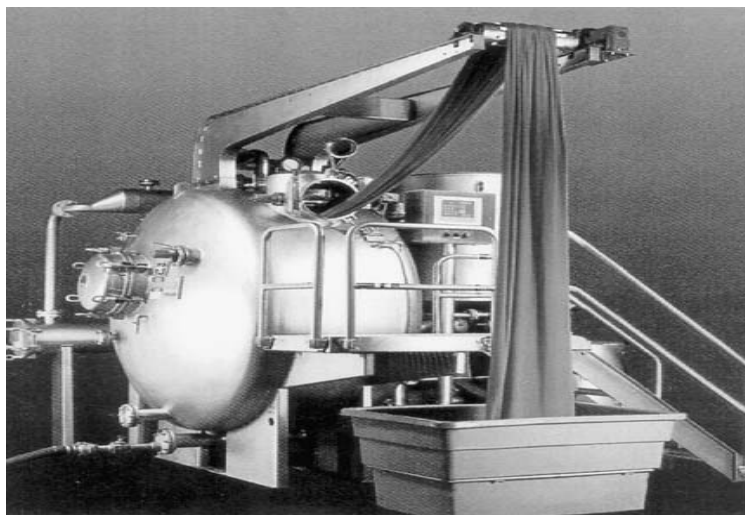
Infelizmente, as indústrias de tingimento possuem grande destaque dentre os vários segmentos produtivos que podem degradar a qualidade ambiental, pois são geradoras de grandes volumes de efluentes, com alta carga orgânica e demanda bioquímica de oxigênio, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, forte coloração e pouca biodegradabilidade (PEREIRA; FREIRE, 2005).

### **1.1.1 Processo de tingimento**

A tecnologia moderna no tingimento consiste de inúmeras etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Durante o processo de tingimento três etapas são consideradas importantes: a montagem, a fixação e o tratamento final. A fixação do corante à fibra é feita através de reações químicas, da simples insolubilização do corante ou de derivados gerados e ocorre usualmente em diferentes etapas durante a fase de montagem e fixação. Entretanto, todo processo de tintura envolve como operação final uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes (GUARATINI; ZANONI, 2000). Nestes banhos, estima-se que aproximadamente 10 a 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos e alcançam o efluente industrial, contaminando o meio ambiente (RAJAGURU et al., 1999). O que se torna um fator preocupante, visto que cerca de um milhão de toneladas é dispersa no ambiente (SHINTAKU; IMBROISI; SANTOS, 2006). A principal fonte desta perda corresponde à incompleta fixação dos corantes durante a etapa de tingimento das fibras têxteis (GUARATINI; ZANONI, 2000).

A Figura 1 mostra um tecido durante o banho de tingimento.



**FIGURA 1.** Etapa do processo de tingimento, mostrando o tecido sendo imerso num banho contendo corantes, água e várias substâncias químicas. Fonte: MOORE; AUSLEY, 2004.

Além desse processo de tingimento, no qual o tecido é imerso num banho contendo várias substâncias e corantes, existe um outro meio de coloração, o processo contínuo. Nesse processo aplica-se calor e vapor ao longo de rolos de tecidos através de uma série de soluções químicas concentradas. O tecido retém a maioria dessas substâncias químicas e, conforme dito anteriormente, os banhos de lavagem removem boa parte delas (MOORE; AUSLEY, 2004).

A forma de fixação da molécula do corante às fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente 4 tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e covalentes (GUARATINI; ZANONI, 2000).

### 1.1.2 Fibras têxteis

As fibras utilizadas na indústria têxtil podem ser divididas em dois grandes grupos denominados fibras naturais e fibras sintéticas (GUARATINI; ZANONI, 2000). As fibras naturais são derivadas de vegetais ou animais, como exemplo tem-se algodão, linho e seda. Já as fibras sintéticas são polímeros orgânicos, na maioria derivados de fontes de petróleo, por exemplo, *polyester* e poliamida (MOORE; AUSLEY, 2004).

### Classificação dos corantes

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), de acordo com o método pelo qual o corante é fixado à fibra têxtil, eles podem ser classificados em:

**Corantes Reativos** - são corantes contendo um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas.

**Corantes Diretos** - Este grupo de corantes caracteriza-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose, etc.) através de interações de Van der Waals.

**Corantes Ácidos** - O termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos.

**Corantes à Cuba** - É uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides.

**Corantes de Enxofre** - É uma classe de corantes que após a aplicação se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos (-Sn-), os quais são altamente insolúveis em água.

**Corantes Pré- Metalizados** - Os corantes são caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos.

**Corantes Branqueadores** - Estes corantes apresentam grupos carboxílicos, azometino (-N=CH-) ou etilênicos (-CH=CH-) aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos que proporcionam reflexão por fluorescência na região de 430 a 440 nm quando excitados por luz ultra-violeta.

**Corantes Dispersivos** - Constituem uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão (partículas entre 1 a 4 micra). Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa (finalmente dividido) sobre o acetato de celulose. O grau de solubilidade do corante deve ser pequeno, mas definido e influencia diretamente o processo e a qualidade da tintura. Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tinturas de fibras sintéticas, tais como: acetato celulose, *nylon*, *polyester* e poliacrilonitrila.

**Azo corantes** - Os corantes estudados neste trabalho pertencem à classe dos dispersivos com função azo, caracterizados como corantes orgânicos e que possuem ao menos uma ligação azo, apresentando boa fixação em fibras sintéticas. Desta forma, será dada maior ênfase a esta classe de corantes.

A molécula do corante utilizada para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra (KUNZ et al., 2000).

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azo corantes, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos -N=N- ligados a sistemas aromáticos (KUNZ et al., 2000). Mais da metade dos corantes produzidos anualmente pertence a esse grupo. Presumivelmente mais de 2000 diferentes azo corantes são usados para tingir vários materiais, sendo que a maior parte é empregada em tingimento de tecidos (STOLZ, 2001). Essa grande utilização se deve ao fato desses corantes permitirem um método de tingimento de fibras celulósicas (especificamente alongadas) com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade em relação às outras classes (GUARATINI; ZAZONI, 2000).

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

### Toxicidade e genotoxicidade dos azo corantes

Vários estudos têm demonstrado que os efeitos deletérios da presença de azo corantes nos corpos d'água vão muito além da poluição visual (mudanças na intensidade e na tonalidade da coloração das águas). A alteração na penetração da luz devido à interação desta com os corantes pode interferir nos ciclos biológicos da biota aquática, especialmente no processo de fotossíntese e na oxigenação do corpo d'água (PEREIRA; FREIRE, 2005).

Outro fator preocupante é a potencialidade de provocar dano ao material genético que alguns corantes desse grupo possuem. Estudos utilizando microorganismos e células de mamíferos têm demonstrado que vários azo corantes

apresentam atividade mutagênica e genotóxica (AL-SABTI, 2000; JAGER; HAFNER; SCHNEIDER, 2004; WANG et al., 2004). Essa atividade está intimamente relacionada com a natureza e posição dos substituintes ligados ao grupo azo (CHUNG; CERNIGLIA, 1992). Por exemplo, o 3-metoxi-4-aminoazobenzeno é um potente carcinógeno para ratos e extremamente mutagênico para bactérias, enquanto que o 2-metoxi-4-aminoazobenzeno é aparentemente não carcinogênico e fracamente mutagênico (HASHIMOTO et al., 1977). Como pequenas variações na molécula dos corantes alteram as suas propriedades genotóxicas, é importante que cada azo corante seja testado individualmente (UMBUZEIRO et al., 2005a). Chung e Cerniglia (1992) fizeram uma revisão sobre vários azo corantes já avaliados pelo ensaio *Salmonella*/microsoma, que mostra a importância da estrutura química na mutagenicidade dos azo corantes. No item 5 do presente trabalho este assunto será discutido de forma mais aprofundada.

No passado, azo corantes baseados em benzidina, 3,3'-diclorobenzidina, 3,3'-dimetilbenzidina e 3,3'-dimetoxibenzidina foram sintetizados em larga escala. Estudos em trabalhadores expostos demonstraram que ocorre azo-redução desses corantes no homem, o que pode vir a explicar os casos de câncer de bexiga observados (GOLKA; KOPPS; MYSLA, 2004). Devido a esta toxicidade, os corantes que ao serem clivados geram benzidina foram proibidos pela Comunidade Européia (ETAD, 2002). Entretanto, a literatura especializada mostra que devido a problemas econômicos, países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não cessaram completamente a produção de alguns corantes à base de benzidinas (e.x. Congo Red 14) de grande potencialidade econômica (GUARATINI; ZANONI, 2000). Um estudo realizado recentemente no Brasil demonstrou a presença desta amina aromática no efluente lançado por uma indústria de tingimento, demonstrando que este composto ainda faz parte dos processos industriais (MAZZO et al., 2006).

Os azo corantes que entram no organismo humano através da ingestão podem ser metabolizados em aminas aromáticas pelas azoredutases produzidas pela microflora intestinal. Se eles são nitro-azo corantes, eles também podem ser metabolizados pelas nitroredutases produzidas pelos mesmos microorganismos ou por enzimas presentes no citoplasma de células de mamíferos, como as xantinas oxidases, ou ainda, pelo citocromo P450, daí a importância do uso da fração S9 nos



testes de mutagenicidade com *Salmonella*, que será discutido posteriormente (NOVOTNY et al., 2006). Enzimas do fígado e de outros órgãos de mamíferos podem também catalisar a clivagem redutiva da ligação azo e a nitroredução do grupo nitro; entretanto, tem sido mostrado que azoredutases e nitroreduções da microflora intestinal desempenham um papel mais importante nesse tipo de metabolismo (SWEENEY et al., 1994; UMBUZEIRO et al., 2005a). Desta forma, o intestino delgado é um possível órgão alvo de carcinogênese pela exposição a azo corantes (SWEENEY et al., 1994). Em ambos os casos, se são formadas N-hidroilaminas, elas são capazes de causar danos ao DNA.

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

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

Neste trabalho foram estudados os azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 (item 3.1.1). É importante salientar que estes corantes estão sendo largamente utilizados por indústrias de tingimento no Brasil e não foram encontradas na literatura quaisquer informações sobre o metabolismo ou atividade mutagênica dos mesmos.

### **1.1.3 Genotoxicidade e Mutações**

Uma substância é dita genotóxica quando tem a capacidade de reagir com o DNA diretamente ou após sua ativação metabólica, produzindo danos em sua estrutura e/ou função (WEISBURGER, 1999). Quando esses danos são transmitidos à descendência diz-se que ocorreu uma mutação (SANTELLI, 2003). As mutações

forneem a variação genética na qual a seleção da evolução opera (GRIFFITHS, et. al, 2001a). Porém, elas são responsáveis por várias doenças hereditárias humanas, entre elas o câncer (GRIFFITHS, et al., 1998a). Sua ocorrência se d de maneira espontânea ou induzida por mutágenos (LEWIS, 2004).

### Níveis em que ocorre uma mutação

Uma mutação pode ocorrer em dois níveis diferentes:

- Mutação cromossômica: segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros ou mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram (GRIFFITHS, et al., 1998a).
- Mutação gnica: os eventos mutacionais ocorrem dentro de genes individuais (GRIFFITHS, et al., 1998a).  também denominada de mutação de ponto, uma vez que as alterações ocorrem em pares de bases únicos do DNA ou num pequeno número de bases adjacentes (GRIFFITHS, et. al, 2001b). O ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, utilizado neste trabalho, detecta mutações de ponto. Assim, esta forma de mutação será mais detalhada a seguir.

### Tipos de mutação de ponto

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

A Tabela 1 mostra alguns dos principais tipos de mutações gênicas em nível molecular.

**TABELA 1.** Mutações gênicas em nível molecular. (Fonte: Modificado de GRIFFITHS et al., 2001b).

Tipo de mutação	Resultado e exemplo (s)
<b>Substituição de um único par de bases</b>	
Transição	Purina substituída por purina diferente, ou pirimidina substituída por pirimidina diferente: C.G → T.A   T.A → C.G
Transversão	Purina substituída por uma pirimidina, ou pirimidina substituída por uma purina  A.T → C.G   A.T → T.A   G.C → T.A   G.C → C.G T.A → G.C   T.A → A.T   C.G → A.T   C.G → G.C
<b>Deslocamento de quadro de leitura</b>	
Adição ou deleção de um único par de nucleotídeos: mudança de matriz de leitura Adição ou deleção de vários a muitos pares de nucleotídeos	Qualquer deleção ou pares de bases que não seja um múltiplo de 3 muda a matriz de leitura nos segmentos de DNA que codificam proteínas, resultando em aminoácidos diferentes neste ponto e em geral termina a cadeia.

Os mutágenos induzem mutações por uma variedade de mecanismos. Alguns mimetizam bases normais e são incorporados no DNA, onde fazem um mau pareamento. Outros danificam bases e causam ou um mau pareamento específico ou destroem um pareamento causando não-reconhecimento de bases (GRIFFITHS, et. al, 2001b).

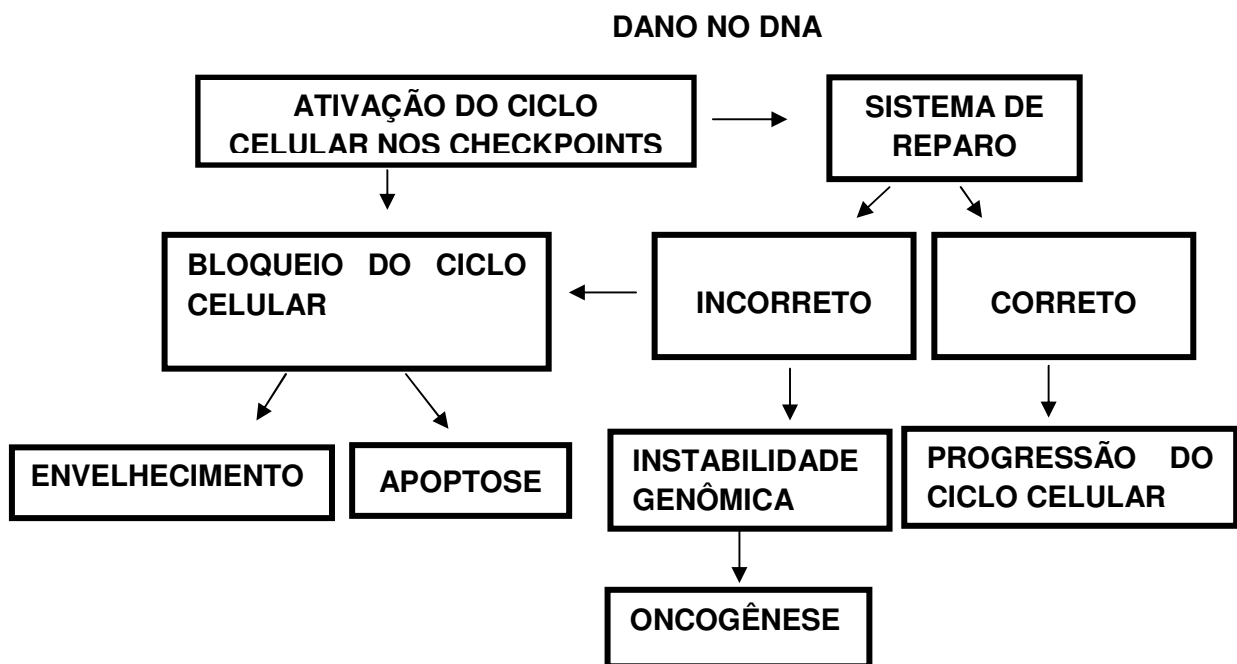
Nas linhagens de *Salmonella* utilizadas no ensaio existem seqüências de bases nitrogenadas que direcionam as mutações para determinados pontos do DNA, são os chamados *hot spots*, discutidos posteriormente (MARON; AMES, 1983).

As células vivas desenvolveram uma série de sistemas enzimáticos que reparam o DNA danificado por uma variedade de mecanismos. Alguns sistemas enzimáticos neutralizam compostos potencialmente danosos antes que eles reajam

com o DNA (GRIFFITHS, et al., 2001b). Outros já agem sobre o próprio dano no DNA (BROWN, 1999). Uma falha nestes sistemas pode levar a uma maior taxa de mutação (GRIFFITHS, et al., 1998b).

Baseado no exposto, quando acontece um dano no DNA, vários são os eventos que podem ocorrer, como ilustrado na Figura 2. Em células sob proliferação, será ativado o ciclo celular, conduzindo a um bloqueio no mesmo, o que fornecerá tempo para que o mecanismo de reparo seja ativado. Em células diferenciadas o sistema de reparo será ativado diretamente. Quando o reparo é completo, a célula poderá prosseguir o seu ciclo. Se o dano não puder ser reparado ou se houver muitas lesões no DNA, o ciclo celular poderá ser bloqueado permanentemente, conduzindo ao envelhecimento da célula ou induzindo apoptose. Se lesões não reparadas permanecerem sem serem detectadas, acarretará o aparecimento de mutações e instabilidade genômica, o que poderá conduzir à oncogênese (HOUTGRAAF; VERSMISSEN; GIESSEN; 2006).

A Figura 2 mostra a resposta celular para os diferentes tipos de dano ao DNA.



**FIGURA 2.** Fluxograma da resposta celular para os diferentes tipos de dano ao DNA (Fonte: HOUTGRAAF; VERSMISSEN; GIESSEN; 2006).

#### 1.1.4 Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

Desde o início dos anos 70, muitos testes têm sido desenvolvidos com a finalidade de avaliar o potencial mutagênico de substâncias. Mas somente poucos métodos são sensíveis o suficiente para detectar mutágenos em amostras ambientais (REIFFERSCHIED; HEIL, 1996).

O teste de *Salmonella*/microssoma, ou Teste de Ames, envolveu vários anos desde as pesquisas iniciais, nas quais se tentava identificar o mapa dos genes responsáveis pela biossíntese da histidina utilizando *Salmonella typhimurium*. No decorrer destas pesquisas, foi produzido grande número de mutantes dessa espécie. As mutações ocorriam no operon da histidina e se originavam espontaneamente, por radiação ou induzidas por químicos. Com isso, as bactérias não conseguiam crescer na ausência de histidina. Mais tarde observou-se que algumas dessas linhagens podiam ser usadas para identificar e caracterizar mutágenos devido à capacidade de reverter a mutação e crescer quando em contato com um mutágeno (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Em 1966, Ames e Whitfield propuseram uma série de linhagens mutantes para pesquisar a mutagenicidade de substâncias químicas usando um procedimento, *spot test*, que foi previamente utilizado por Szybalski e Lyer em uma linhagem de *E. coli* (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Em 1973, Ames et al. desenvolveram um ensaio de incorporação em placa que é mais sensível e quantitativo que o *spot test* (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Em 1983, Maron e Ames publicaram o protocolo usado mundialmente, no qual se utiliza incorporação em placas e pré-incubação. Nesse mesmo ano, Kado, Langley e Eisenstadt (1983) desenvolveram um método empregando microssuspensão, que apresenta maior sensibilidade que o teste de Ames tradicional. Esta metodologia utilizando microssuspensão é interessante quando se dispõe de pouca quantidade de amostra ou quando se pretende usar maior número de linhagens (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Este teste está em uso há mais de 20 anos devido a sua alta sensibilidade (83%) e reconhecida validação (JARVIS, et al., 1996; KAPLAN et al., 2004). Além

disso, é recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) para proteção da saúde humana e do meio ambiente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004) e reconhecido por comunidades científicas, agências e corporações governamentais (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). É usado mundialmente como um ensaio inicial para determinar o potencial mutagênico de novas drogas e substâncias químicas porque há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Em 1998, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) incluiu o teste de mutagenicidade com *Salmonella* na rede de monitoramento a fim de avaliar mais adequadamente a qualidade da água (UMBUZEIRO et al., 2001d).

Em 2006, por meio da Resolução Consema nº 129, a Secretaria do Meio Ambiente de Rio Grande do Sul implantou o teste de mutagenicidade com *Salmonella* com a finalidade de preservar a qualidade ambiental, de saúde pública e dos recursos naturais, quanto ao lançamento de efluentes líquidos em águas superficiais nesse estado (RIO GRANDE DO SUL, 2006).

Hoje, a realização do teste em efluentes industriais já é requerida para obtenção de licença de funcionamento e instalação de indústrias consideradas prioritárias em estudo prévio de triagem no estado de New Jersey, EUA e foi proposto como procedimento necessário para análise de poluentes dentro do programa "Clean Water Act" (CWA) da USEPA - United States Environmental Protection Agency -, 1989. Além disso, está descrito desde a 18ª edição do *Standart Methods for the Examination of Water & Wastewater* de 1992, como método proposto e aprovado em 1990 (ROUBICEK, 2001).

#### *Linhagens de Salmonella typhimurium*

As linhagens de *Salmonella* usadas no ensaio pertencem ao grupo de Enterobactéria capazes de produzir azoredutase e nitroredutase, especialmente construídas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou

substituição de pares de base no DNA (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL [CETESB], 1997; UMBUZEIRO et al., 2005a).

Conforme já exposto, estas linhagens sofrem mutações nos genes responsáveis pela biossíntese da histidina e como resultado não conseguem produzir este aminoácido (JARVIS, et al., 1996). Cada uma dessas mutações é projetada para responder aos mutágenos que agem por mecanismos diferentes, o que torna a combinação de linhagens de *Salmonella* uma ferramenta importante na elucidação do mecanismo de ação mutagênica de diversos compostos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Outra mutação é necessária para que retomem a capacidade de crescer na ausência do referido aminoácido. Essa mutação ocorre quando as bactérias usadas são expostas a agentes mutagênicos.

Linhagens tradicionais de *Salmonella*, como a TA98, embora tenham capacidade de reduzir compostos do tipo nitro, apresentam menor atividade de nitroredutase do que sua linhagem parental LT2. Esta redução na atividade é devida à deleção de um dos genes responsáveis pela produção desta enzima (PORWOLLIK et al., 2001). Além disso, outras linhagens foram desenvolvidas, algumas incapazes de produzir essa enzima (TA98 NR e TA100 NR), e outras com alta produção da mesma (YG1021 e YG1026). Resultados de testes empregando estas linhagens são úteis para a compreensão do papel da redução do grupo nitro na mutagenicidade de certos compostos. Com o mesmo objetivo, linhagens com deficiência de atividade de O-acetiltransferase (TA98 DNP6) ou com alta produção desta enzima (YG1024 e YG1029) estão disponíveis. Além disso, linhagens com alta produção de ambas as enzimas, nitroredutase e O-acetiltransferase (YG1041 e YG1042) foram desenvolvidas. A combinação destas linhagens pode auxiliar na elucidação do papel destas enzimas na atividade mutagênica de azo corantes. Assim, o ensaio *Salmonella*/microsoma, apesar de ser um teste bacteriano, é uma ferramenta importante capaz de predizer os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria, com características metabólicas similares à flora intestinal de mamíferos (OLIVEIRA, 2005; UMBUZEIRO et al., 2005a).

Outro fator importante é que as linhagens usadas podem reverter espontaneamente a auxotrofia para histidina (His-) e assim podem crescer em um

meio pobre no referido aminoácido. Esta é uma reversão espontânea relativamente fraca que pode ser aumentada através de mutações. Cada linhagem tem uma faixa característica de reversão espontânea. O aumento desta taxa permite avaliação do potencial mutagênico das substâncias analisadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; GAHYVA; JUNIOR, 2005;).

Além da mutação no operon da histidina, mutações adicionais foram criadas para tornar as bactérias mais sensíveis a uma grande variedade de substâncias, como pode ser verificado abaixo:

- Mutação *rfa*: Todas apresentam esta mutação que causa perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos da parede bacteriana, tornando a bactéria mais permeável a moléculas volumosas como as aminas aromáticas, hidrocarbonetos e aflatoxinas (MARON; AMES, 1983; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).
- Deleção *uvrB*: Nessa mutação ocorre deleção do gene *uvrB*, um dos genes responsáveis pelo reparo da molécula de DNA por excisão, o que permite que maior número de lesões sejam reparadas por mecanismos de reparo sujeitos a erro, aumentando assim a sensibilidade na detecção de mutágenos (MARON; AMES, 1983; CLAXTON et al., 1987; MORTELMANS ; ZEIGER, 2000). Por razões técnicas a deleção no gene *uvrB* se estendeu através do gene da biotina e como conseqüência, essas linhagens também requerem a presença dessa vitamina para o seu crescimento, com exceção da TA102, uma vez que ela foi construída primariamente para detectar mutágenos que necessitam de um sistema de reparo por excisão intacto (MARON; AMES, 1983). Em 2001, Porwollik et al. analisaram a mutação  $\Delta$ *uvrB* em diferentes linhagens e verificaram que 15 a 119 genes foram afetados, além do gene da biotina, inclusive uma importante nitroreductase.
- Plasmídio pKM101: Esse plasmídio foi introduzido nas linhagens TA1535 e TA1538, resultando em correspondência isogênica às linhagens TA100, TA98, TA97, TA102 e TA104. É responsável pelo aumento do reparo do tipo *error-prone*, o que aumenta a sensibilidade da linhagem na detecção de mutágenos (CLAXTON et al., 1987). Este tipo de sistema de reparo, também chamado sistema SOS, é induzido como uma resposta emergencial para



evitar a morte celular na presença de dano significativo ao DNA. A indução de SOS é um último recurso, que permite que a célula troque a morte por certo nível de mutagênese (GRIFFITHS, et al., 2001b). Este plasmídeo tem como marcador a resistência à ampicilina (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

- Plasmídeo pAQ1: Presente na linhagem TA102, esse plasmídeo multicópia carrega a mutação hisG428, amplificando o número de sítios específicos para mutagênese. Apresenta como marcador a resistência à tetraciclina (MARON; AMES, 1983).
- Plasmídeo pYG233: Presente nas linhagens YG1041 e YG1042, esse plasmídeo carrega os genes que codificam as enzimas nitrorredutase e O-acetiltransferase da *Salmonella typhimurium*. Tem como marcador a resistência à canamicina (HAGIWARA et al., 1993).

Como já foi dito, a combinação de linhagens de *Salmonella* é uma ferramenta muito útil na identificação do grupamento químico responsável pelo efeito detectado em determinada amostra (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Como exemplo pode ser citada a possibilidade de identificação de grupamentos nitro quando é comparada a resposta da linhagem YG1041, que possui superprodução de nitrorredutase com a sua parental TA98. Os genótipos das linhagens empregadas no presente estudo estão mostrados na Tabela 2.

**TABELA 2.** Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma empregadas no presente trabalho.

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	hisD3052 <sup>1</sup> , rfa <sup>2</sup> , Δbio <sup>3</sup> , ΔuvrB <sup>4</sup> , pKM101 (Ap <sup>r</sup> ) <sup>5</sup>	Deslocamento do quadro de leitura	Maron e Ames (1983)
TA100	hisG46 <sup>1</sup> , rfa <sup>2</sup> , Δbio <sup>3</sup> , ΔuvrB <sup>4</sup> , pKM101 (Ap <sup>r</sup> ) <sup>5</sup>	Substituição de pares de bases	Maron e Ames (1983)
YG1041	hisD3052 <sup>1</sup> , rfa <sup>2</sup> , Δbio <sup>3</sup> , ΔuvrB <sup>4</sup> , pKM101 (Ap <sup>r</sup> ) <sup>5</sup> , com alta produção de nitrorredutase e O-acetiltransferase (pYG233) (Cn <sup>r</sup> ) <sup>6</sup>	Deslocamento do quadro de leitura	Umbuzeiro et al. (2005a) e Cerná et al. (2000)
YG1042	hisG46 <sup>1</sup> , rfa <sup>2</sup> , Δbio <sup>3</sup> , ΔuvrB <sup>4</sup> , pKM101 (Ap <sup>r</sup> ) <sup>5</sup> , com alta produção de nitrorredutase e O-acetiltransferase (pYG233) (Cn <sup>r</sup> ) <sup>6</sup>	Substituição de pares de bases	Oliveira (2005)

<sup>1</sup> his mutação responsável pela síntese da histidina

<sup>2</sup> rfa permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

<sup>3</sup> dependência à biotina

<sup>4</sup> Δ uvrB deleção do gene uvrB

<sup>5</sup> Ap<sup>r</sup> ampicilina resistente

<sup>6</sup> Cn<sup>r</sup> canamicina resistente

Conforme dito anteriormente, as linhagens de *Salmonella* possuem seqüências de bases nitrogenadas com maior possibilidade de interação com mutágenos (*hot spot*). Nas linhagens TA98 e YG1041 essa seqüência é constituída de oito resíduos CG -CGCGCGCG- repetitivos. Já nas linhagens TA100 e YG1042 essa seqüência resulta da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC) (MARON; AMES, 1983).

#### Uso do sistema de metabolização exógeno (S9)

Alguns produtos químicos, como aminas aromáticas ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos necessitam ser metabolizados para exercerem seus efeitos mutagênicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Como as bactérias não têm o sistema de oxidação Citocromo P450 usado pelos vertebrados em biotransformação de compostos exógenos é importante mimetizar esse sistema nos ensaios. Tal procedimento é feito mediante adição de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com o indutor enzimático Aroclor-1254 (S9). Assim, as substâncias que exercem sua atividade mutagênica após metabolização via citocromo P450 serão detectadas pela adição de S9 e aquelas que não necessitam desse sistema de oxidação para exercerem seu efeito mutagênico, serão identificados na ausência de S9 (JARVIS, et al., 1996).

A maioria dos mutágenos genotóxicos que comprovadamente causam tumores em seres humanos é considerada pré-carcinógeno, ou seja, são compostos estáveis no pH fisiológico e, portanto, incapazes de reagir com o DNA. Esses mutágenos são biotransformados por enzimas como citocromo P450 (CYP) e glutiona s-transferases (GTS), em compostos mais hidrossolúveis e, portanto passíveis de serem excretados. Em alguns casos, os produtos gerados são extremamente eletrofílicos (uma característica comum dos mutágenos genotóxicos ambientais) e irão reagir com centros nucleofílicos das células, dentre eles regiões do DNA, levando à formação de adutos. Tais adutos, quando não reparados corretamente, podem levar ao aparecimento de uma mutação permanente no DNA, que pode ser pontual ou cromossômica, dependendo da quantidade e tipo do mutágeno ambiental (PINTO; FELZENSZWALB, 2003).

### Controles positivos e negativos

O ensaio é feito sempre com controles negativos e positivos, de forma a assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica (MARON; AMES, 1983). O controle negativo deverá ser o solvente utilizado para dissolver as amostras e o volume por placa o mesmo utilizado para a amostra (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). Além disso, o controle negativo é necessário para estabelecer o número de colônias revertentes espontâneas (MARON; AMES, 1983). Utilizam-se como controles positivos, compostos mutagênicos específicos para cada linhagem em concentrações definidas (MARON; AMES, 1983; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). A Tabela 3 lista os controles utilizados para as linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste estudo, bem como as doses.

**TABELA 3.** Controles positivos e negativos para as linhagens de *S.typhimurium* utilizadas neste trabalho

Linhagem	Controles (µg/placa)				Referências
	Positivos		Negativos		
	+S9	- S9	+S9	- S9	
TA98	2-aminoantraceno (2,5)	4-nitroquinolina-1-óxido (0,5)	DMSO*		Maron e Ames (1983)
TA100	2-aminoantraceno (2,5)	4-nitroquinolina-1-óxido (0,5)	DMSO*		Oliveira (2005)
YG1041	2-aminoantraceno (0,0625)	4-nitro-o-fenilene-diamina (10,0)	DMSO*		Oliveira (2005) Rech (2007) <sup>1</sup>
YG1042	2-aminoantraceno (2,5)	2-nitrofluoreno (10,0)	DMSO*		Oliveira (2005) Rech (2007) <sup>1</sup>

\* DMSO dimetilsulfóxido

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

1 Informação fornecida por RECH (2007)

### Aplicações

O teste de *Salmonella*/microsossoma pode ser aplicado para a avaliação da qualidade do ar, esgoto, sedimentos, efluentes do processo industrial, água para consumo humano, tecidos animais, solos (JARVIS, et al., 1996), além de produtos químicos, naturais, sintéticos, fitoterápicos (SBMCTA, 2004). É parte das baterias de ensaios internacionalmente propostos para registro de medicamentos, outras drogas, formulações químicas, incluindo as substâncias ou misturas com ampla utilização na agricultura (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Além disso, tem sido muito empregado em estudos para elucidação de mecanismos de mutagênese e anti-mutagênese e na avaliação de efeitos sinérgicos de misturas de compostos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Este ensaio pode ainda ser utilizado como auxiliar no estabelecimento do órgão alvo de compostos tóxicos. UMBUZEIRO et al., (2005a), estudando o espectro de mutagenicidade do azo corante Disperse Blue 291, utilizaram as linhagens com superprodução de nitrorredutase e O-acetiltransferase (YG1041 e YG1042) e linhagens deficientes na produção dessas enzimas (TA98NR e TA98BNP<sub>6</sub>). Através dos resultados obtidos, os autores sugerem que o intestino seja o principal órgão alvo para a atividade mutagênica do corante em casos de exposição por via oral, devido à geração de compostos eletrofílicos pela microflora intestinal, por meio das nitroredutases e azoredutases. Ao se adicionar a fração S9, observa-se que os radicais formados pelas enzimas citadas podem sofrer metabolização hepática via citocromo P450 e gerar outros compostos genotóxicos, o que torna o fígado e a bexiga como órgãos alvo além do intestino (UMBUZEIRO et al., 2005a).

### Modificações do Teste de Ames – Protocolos de ensaios

Desde o seu desenvolvimento por Dr. Bruce Ames e seus colaboradores, o teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* tem sido usado amplamente pelo mundo. Muitos autores têm sugerido várias modificações e recomendações em torno desse ensaio a fim de aperfeiçoar cada vez mais a metodologia (CLAXTON et al., 1987):

- Teste de incorporação em placas: este teste consiste em adicionar as linhagens de *Salmonella* e a amostra a ser testada em uma placa de agar mínimo

(suplementado com biotina e traços de histidina) na presença e ausência de sistema de ativação metabólica (S9) (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

- Teste de pré-incubação: Este teste é uma modificação do ensaio de incorporação em placas e envolve a exposição das linhagens, da substância teste, do tampão ou da mistura S9 por um curto período de tempo (usualmente 30 minutos) a 37°C em um pequeno volume de mistura (0,5 mL) antes do plaqueamento em agar mínimo. Acredita-se que os metabólitos mutagênicos de vida curta têm uma maior possibilidade de interagir com as linhagens em um pequeno volume de mistura pré-incubada se comparado com o plaqueamento imediato. Além disso, o volume menor possibilita maior concentração de S9 e co-fatores (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

- Teste de microssuspensão: Para o método de microssuspensão, também chamado Teste de Kado, utiliza-se as culturas pernoite concentradas 10 vezes, por centrifugação a 10000 g, por 10 minutos, a 4°C. Para o teste em ausência de sistema de metabolização utiliza-se igual volume de tampão fosfato diluído 1/13 (50 µL). A mistura é incubada a 37°C por 90 minutos, e depois de adicionada ao agar de superfície, faz-se o plaqueamento (KADO et al., 1983; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). Quando comparado com o método de incorporação em placas, o teste de microssuspensão apresenta aumento na sensibilidade. Provavelmente tal fato ocorra devido a maior concentração de reagentes e aumento do número de bactérias adicionadas. Além disso, é provável que um número maior de bactérias aumente o número de “alvos” disponíveis para interagirem com os mutágenos (KADO et al., 1983). Esta metodologia é interessante quando se dispõe de pouca quantidade de amostra ou quando se pretende usar maior número de linhagens (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

### Interpretação dos resultados

Para todos os protocolos, o número de revertentes no controle negativo é a taxa de reversão espontânea obtidas nas condições do ensaio. Ao se tratar essa mesma cultura com doses crescentes de um agente ou mistura de compostos com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao número das doses de exposição, até um platô, aonde as

doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA ou, pela ação de outros compostos tóxicos presentes na amostra (OLIVEIRA, 2005).

Espera-se, portanto uma relação dose resposta entre o número de revertentes por placa e as doses de uma amostra com atividade mutagênica (OLIVEIRA, 2005).

A análise de variância (ANOVA) é aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre o controle negativo e as doses aplicadas, seguida de regressão linear. A potência da amostra é expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. São várias as formas de expressão dos resultados, porém a inclinação da reta é sempre proporcional à potência da amostra. Em geral, diferenças significativas entre doses testadas e o controle negativo, e relação dose-resposta comprovadas estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra, porém cada ensaio tem seu critério específico, normalmente baseado na sua reprodutibilidade e características intrínsecas das linhagens teste (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003; OLIVEIRA, 2005).

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

## 2. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O protocolo de pré-incubação é adequado à avaliação dos corantes
- Os corantes são mutagênicos nas condições padronizadas, principalmente quando testados com as linhagens com super produção de nitroredutase e o-acetiltransferase.
- O grupamento nitro presente em todos os corantes estudados é de fundamental importância para a mutagenicidade.
- A O-acetiltransferase pode agir, ainda no grupamento amina localizada na posição *p* em relação a azo ligação do corante Disperse Orange 1, sugerindo a inespecificidade desta enzima em relação ao oxigênio.
- A presença do cloro no Disperse Red 13 e da amina secundária do Disperse Orange 1 reduziu a mutagenicidade em relação ao Disperse Red 1, provavelmente por esses substituintes promoverem a diminuição da densidade eletrônica no grupamento azo.
- A ativação metabólica reduz a atividade mutagênica dos corantes analisados.
- Os nossos resultados estão em concordância com a literatura. Numa revisão feita por Chung e Cerniglia (1992) todos os azo corantes contendo o grupamento nitro avaliados apresentaram atividade mutagênica com o ensaio *Salmonella*/microsoma, assim como os corantes estudados neste trabalho.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBERTINI, R.J. The use and interpretation of biomarkers of environmental genotoxicity in humans. **Biotherapy**, v. 11, p. 155–167, 1998.

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

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

ASHBY, J.; P.A. LEFEVRE; R.D. CALLANDER. The possible role of azoreduction in the bacterial mutagenicity of 4-dimethylaminoazobenzene(DAB) and 2 of its analogues (6BT and 5I), **Mutation Research**.v. 116, p.271-279, 1983.

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

BERLIN, Y. A.; BURIN, A.L.; RATNER, M.A. DNA as a molecular wire. **Superlattices and Microstructures**, v. 28, p. 241-252, 2000.

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

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

BROWN, J.P., G.W. ROEHM AND R.J. BROWN. Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the Salmonella/microsome system, **Mutation Research**. v.56, p.249-271, 1978.

BROWN, J.P.; P.S. DIETRICH. Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the Salmonella/microsome assay: Use of aerobic and anaerobic activation procedures, **Mutation Research**. v. 116, p.305-315, 1983.



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

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

CHUNG, K.-T.; G.E. FULK ; A.W. ANDREWS. Mutagenicity testing of some commonly used dyes, *Appl. Environ. Microbiol.* v.42, p. 641-648, 1981.

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

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

CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; WARNER, J.R.; MYERS, L.E.; HUGHES, T.J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: II. With exogenous activation. **Mutation Research**, v.253, p.149-159, 1991.

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

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

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

ETAD Information on the 19th Amendment of the Restrictions on the Marketing and Use of certain azocolourants (Directive 2002/61/EC of the EP and of the EC of 19

July 2002). Disponível em:<<http://www.etad.com/information/information.php>>. Acesso em 28 dez. 2008.

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

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

GARNER, R.C.; C.A. NUTMAN. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA1538, *Mutation Research*. v.44,p.9-19, 1977.

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

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

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

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

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

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

HAGIWARA, Y.; WATANABE, M.; ODA, Y.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing

elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, Amsterdam, v.291, p.171-180, 1993.

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

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

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

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

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

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

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

KÖRBAHTI, B.K. Response surface optimization of electrochemical treatment of textile dye wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v.145., pp.277–286, 2007.

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

LAZEAR, E.J.; S.C. LOUIE. Mutagenicity of some congeners of benzidine in the *Salmonella typhimurium* assay system. **Cancer Lett.**, v. 4, p.21-25, 1978.

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

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

LIN, G.H.Y.; W.E. SOLODAR. Structure-activity relationship studies on the mutagenicity of some azo dyes in the *Salmonella*/microsome assay, **Mutagenesis**. v.3, p. 311- 315, 1988.

MARAN, U.; SILD, S. QSAR Modeling of Genotoxicity on Non-congeneric Sets of Organic Compounds. **Artificial Intelligence Review**, v. 20, p.13–38, 2003.

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

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

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

MOORE, S.B.; AUSLEY, L.W. Systems thinking and green chemistry in the textile industry: concepts, technologies and benefits. **Journal of Cleaner Production**, v.12, p.585–601, 2004.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM BIOASSAY ON-LINE STRUCTURE-INDEX FILE [NTPBSI]. Disponível em [http://www.epa.gov/dsstox03/update-2008-05-02/old/substance\\_files/NTPBSI\\_24458-0.html](http://www.epa.gov/dsstox03/update-2008-05-02/old/substance_files/NTPBSI_24458-0.html)> acesso em 20/03/2008.

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

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

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

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

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

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

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

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I., 2003. Genética do câncer humano. In: **Mutagênese Ambiental**, Eds. Lucia Regina Ribeiro, Daisy Maria Fávero Salvadori & Edmundo Kanan Marques, Editora da ULBRA, capítulo 2, pp. 29-48.

PORWOLLIK, S.; WONG, R.M.Y.; SIMS, S.H.; SCHAAPER, R.M.; DEMARINI, D.M.; MCCLELLAND, M. The  $\Delta$ uvrB mutations in the Ames strains of *Salmonella* span 15 to 119 genes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.483, p.1-11, 2001.

PRIVAL, M.J.; BELL,S.J.; MITCHELL, V.D.; PEIPERL, M.D.; VAUGHAN, V.L. Mutagenicity of benzidine and benzidine-congener dyes and selected monoazo dyes in a modified *Salmonella* assay. **Mutation Research**, v.136, p.33-47, 1984.

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

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

REID, T.M.; M.C. MORTON; C.Y. WANG; C.M. KING Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative systems, **Environ. Mutagen.** v.6, p.705-717, 1984.

REIFFERSCHIED, G.; HEIL, J. Validation of the SOS / umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutation Research**, v. 369, p.129-145, 1996.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K., 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: **Mutagênese Ambiental**, Eds. Lucia Regina Ribeiro, Daisy Maria Fávero Salvadori & Edmundo Kanan Marques, Editora da ULBRA, capítulo 1, pp. 21-28.

RIO GRANDE DO SUL, Resolução Consema nº 129 / 2006. Secretaria do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**. Porto Alegre, 24 de novembro de 2006.

ROUBICEK, D.A. **Estratégias para a detecção de compostos genotóxicos em águas através do uso de diferentes linhagens mutantes de *Salmonella typhimurium***: USP, 2001. 125 páginas. Tese (doutorado). Programa de Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2001.

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

Sera, N.; Fukuhara, K.; Miyata, N.; Tokiwa, H. Mutagenicity of nitrophenanthrene derivatives for *Salmonella typhimurium*: effects of nitroreductase and O-acetyltransferase. **Mutation Research**, v. 349, p.137-144, 1996.

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

SHISHKIN, O. V.; SPONER, J.; HOBZA, P. Intramolecular flexibility of DNA bases in adenine–thymine and guanine–cytosine Watson–Crick base pairs. **Journal of Molecular Structure**, v. 477, p.15–21, 1999.

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

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

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

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

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

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

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECH, C.M.; SATO, M.I.Z.; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, Oxford, 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**, Oxford, v. 491, p.119-126, 2001.

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

TANAKA, K.; T. MII; S. MARIU; I. MATSUBARA; H. IGAKI. Mutagenicity of urinary metabolites of benzidine and benzidine-based azo dyes, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v.49, p.177-185, 1981.

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

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

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

WATANABE, T.; TOMIYAMA, T.; NISHIJIMA, S.; KANDA, Y.; MURAHASHI, T.; HIRAYAMA, T. **Journal of Health Science**, v.51, P.569-575, 2005.

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

YAHAGI, T.; M. DEGAWA; Y. SEINO; T. MATSUSHIMA; M. NAGAO; T. SUGIMURA; Y. HASHIMOTO. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives, **Cancer Lett**. v. 1, p.91-96, 1975.