

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do risco ecogenotóxico
da utilização de corantes têxteis**

Otávio Pelegrino Rocha

Ribeirão Preto
2016

Resumo

ROCHA, O. P. **Avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização de corantes têxteis**. 2016. 100 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Este trabalho teve como objetivo principal a avaliação do risco ecogenotoxicológico dos corantes *Acid Black 210* e *Disperse Violet 93*, utilizados pelas indústrias têxteis e coureiras nacionais e internacionais. Para atingir este objetivo foi realizada uma abordagem integrada da avaliação da toxicidade utilizando a avaliação da permeabilidade através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA), a avaliação do potencial genotóxico através do Ensaio do Cometa com células HepG2, a avaliação do potencial mutagênico do através do Teste de Ames com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na ausência e na presença de metabolização exógena (mistura S9), a avaliação do potencial embriotóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish (Danio rerio)*, e, por fim, juntando os dados disponíveis na literatura científica, a avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização deste corante têxtil. Devido à observação de ausência de toxicidade nos ensaios realizados e nas informações constantes da literatura científica, não há indícios de que o *Acid Black 210* apresente ecogenotoxicidade, podendo ser considerado seguro à luz dos conhecimentos atuais. Ainda, este trabalho apresenta a avaliação do potencial genotóxico do corante *Disperse Violet 93* através do Ensaio do Cometa e a avaliação do potencial embriotóxico deste corante através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish (Danio rerio)*. Considerando que houve toxicidade morfofisiológica em embriões de *zebrafish* e que na literatura científica também consta sua mutagenicidade em linhagem de *S. typhimurium* YG1041, o *Disperse Violet 93* necessita de avaliações nos demais níveis tróficos para que uma avaliação do risco seja realizada. Para finalizar, este trabalho apresenta a avaliação do potencial embriotóxico de efluente de curtume pré e pós-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish*, onde o efluente pós-tratamento mostrou menor potencial embriotóxico, porém ambos apresentando (mesmo após diluições) coagulação de ovos fertilizados, edema do saco vitelínico, escoliose, má-formação da cauda e má-formação da bexiga natatória. Estes resultados ressaltam a importância da realização de estudos toxicológicos visando fornecer subsídios para a realização de avaliações do risco do uso de corantes, já que estes se encontram em exposição constante aos seres vivos e ao meio ambiente.

Palavras-chave: *Acid Black 210*. Avaliação de risco. Corantes. *Disperse Violet 93*. Efluentes. Toxicologia.

"O mais difícil não é escrever muito: é dizer tudo, escrevendo pouco."

Júlio Dantas

Introdução

- I -



INTRODUÇÃO

O estudo da toxicologia dos corantes tem como marco inicial o trabalho publicado por Walton e Lawson (1934). Estes autores descreveram a farmacologia e a toxicologia da fenazopiridina, medicamento até hoje utilizado para o alívio da dor decorrente da irritação da mucosa do trato urinário inferior (PFIZER, 2008). A toxicologia dos corantes permaneceu “esquecida” pela comunidade científica até a década de 60, quando a indústria de corantes reconheceu as limitações tecnológicas e científicas que enfrentavam, incluindo os problemas ecotoxicológicos resultantes de suas atividades (ANLIKER, 1979).

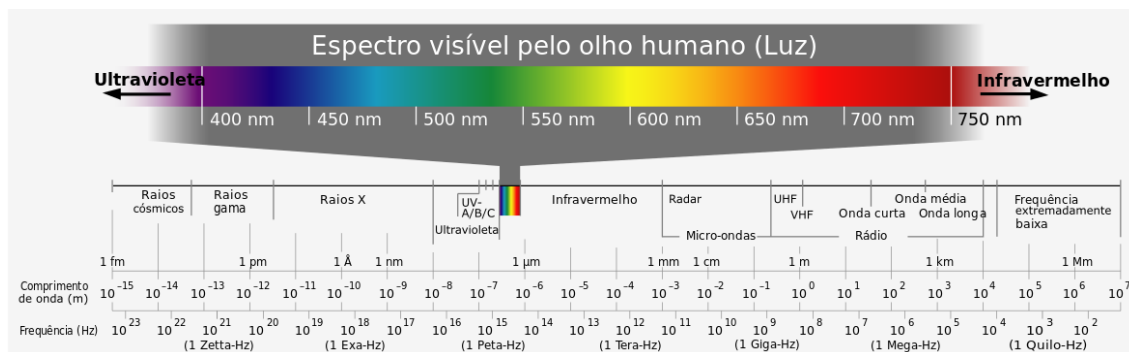
Foi formada, então, a Associação Ecológica e Toxicológica das Indústrias Produtoras de Corantes (ETAD, na sigla em inglês) em 1974, envolvendo empresas da Itália, Índia, Alemanha, Suíça, Japão, Grã-Bretanha, Dinamarca e França, com o objetivo primário de unificar ações que minimizassem possíveis danos ao ambiente provindos do uso e das aplicações de seus produtos, cooperando com as instituições públicas responsáveis pelo controle do impacto ecotoxicológico dos corantes. Em 1977, duas organizações semelhantes foram formadas nos Estados Unidos, uma para a área de corantes (*Dyes Environmental and Toxicology Organization*) e outra para a área de pigmentos (*Dry Color Manufacturers Association*) (ANLIKER, 1979).

Atualmente, os estudos científicos da área são focados na toxicidade intrínseca de cada corante utilizado e na possível contaminação ambiental por estes e por seus produtos de degradação.

1.1 Corantes e sua evolução histórica

Corantes podem ser definidos como substâncias que, quando aplicadas a um substrato, fornecem cor por um processo que altera, pelo menos temporariamente, a estrutura cristalina da substância em questão (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011). A cor depende diretamente da absorção da luz na região visível do espectro de radiação eletromagnética (Figura 1), onde os comprimentos de onda situam-se entre 370 nm (violeta) e 750 nm (vermelho). De acordo com a teoria eletrônica moderna, a cor é gerada pela excitação dos elétrons π na camada de valência pela luz visível (MURRELL, 1963).

Figura 1 – Espectro eletromagnético completo, com destaque para a região visível.



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_vis%C3%ADvel#/media/File:Espectro_eletromagnetico-pt.svg

Até a metade do século XIX todos os corantes provinham de fontes naturais. O primeiro registro sobre a utilização de corantes naturais data de 2.600 anos a.C. na China, porém a história do homem é acompanhada desde o começo pela utilização de corantes, como a fuligem (negro de fumo ou *carvon black*) para a pintura das paredes das cavernas. Os corantes também sempre acompanharam as desigualdades sociais da vida em sociedade. Na Roma Antiga, por exemplo, a cor púrpura obtida de espécies de um molusco do gênero *Murex* era símbolo de riqueza e poder, onde somente o imperador possuía o direito de usá-la nas vestes. O imperador Nero chegou a punir com a morte o seu uso. Essa cor ainda é utilizada atualmente pelo alto clero da Igreja Católica como herança por seu significado histórico (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2016).

O primeiro corante orgânico sintetizado foi a mauveína, em 1856, pelo químico britânico William Perkin através da oxidação da anilina com dicromato de potássio. Outros corantes passaram a ser produzidos, dando origem aos fabricantes de corantes sintéticos na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça, suprindo as necessidades das indústrias que fabricavam tecidos, couro e papel. A partir da década de 90, as grandes corporações mundiais implantaram unidades fabris próprias ou em parcerias com fabricantes locais inicialmente na China, na Índia e na Indonésia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2016).

A demanda mundial por corantes e pigmentos orgânicos tem aumentado em 6 % a cada ano, em um mercado com previsão de movimentar aproximadamente US\$ 20 bilhões no ano de 2019. Atualmente, este valor está na faixa dos US\$ 14,5 bilhões (WORLD DYES & ORGANIC PIGMENTS, 2015).

O Brasil também tem sua história diretamente vinculada à utilização de corantes. A começar pelo nome do país, proveniente da madeira pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), fonte natural de corante avermelhado. Durante grande parte do século XIX o Brasil também foi uma das principais fontes do índigo natural provindo da

Indigofera tinctoria. A produção industrial de corantes sintéticos no país foi introduzida após a Primeira Guerra Mundial, e na virada do milênio já supria 60 % da sua demanda doméstica (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Quanto à classificação dos corantes, esta pode dar-se de acordo com sua estrutura química (azo, nitro, nitroso, diarilmetano, dentre outros) ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado ao substrato (ácido, azoico, básico, direto, dispersivos, dentre outros). Para um maior conhecimento das especificidades relacionadas a estas classificações recomendo a leitura na íntegra do artigo “Corantes têxteis” (GUARATINI; ZANONI, 2000).

1.2 A indústria têxtil e coureira nacionais

O setor têxtil representa um dos ramos industriais mais antigos do mundo, sendo um dos precursores da Revolução Industrial. Os povos primitivos já se utilizavam de técnicas de entrelaçamento manual de fibras vegetais produzindo telas grosseiras com diferentes finalidades, incluindo a proteção corporal. Após a década de 50, houve uma grande evolução tecnológica deste setor a partir da incorporação da área química, com mudanças significativas no âmbito produtivo e no comercial (OLIVEIRA, 2013).

Em 2015, o Brasil exportou mais de US\$ 1 bilhão em produtos têxteis e confeccionados, contando com 33 mil empresas formais distribuídas por todo o território nacional, e gerando 1,5 milhões de empregos diretos, além de 8 milhões de empregos indiretos e de efeito renda, dos quais 75 % são de mão de obra feminina. Com isso, o Brasil se tornou o quinto maior produtor têxtil do mundo, com o quarto maior parque produtivo de confecção mundial. Internamente, é o 2º maior empregador da indústria de transformação, perdendo apenas para o conjunto de alimentos e bebidas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO, 2015).

O Brasil ainda é autossuficiente na produção de algodão e referência mundial em moda praia, jeans e *homewear*, tendo crescido também nos segmentos *fitness* e *lingerie*. No Ocidente, é o único país que possui cadeia têxtil completa, desde a produção das fibras (plantação de algodão) até os desfiles de moda, passando por fiações, tecelagens, beneficiadoras, confecções e varejo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO, 2015).

O Brasil também é um dos líderes da indústria coureira mundial. Em reais, o valor exportado de janeiro a abril de 2016 chegou a mais de R\$ 2,6 bilhões, uma alta de 7,1 % em relação aos mesmos meses do ano anterior (CICB, 2016). O salto nas

exportações foi impulsionado pelos novos mercados compradores, que incluem Tailândia, Indonésia e Alemanha, além dos principais e clássicos importadores do couro brasileiro: China, Itália, Hong Kong e Estados Unidos (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014).

Esse posicionamento de excelência provém dos investimentos na área, qualificação dos profissionais envolvidos e desenvolvimento de novas tecnologias. Segundo especialistas, poucos setores da economia brasileira têm a capilaridade e o potencial apresentados pela indústria do couro e peles. Além disso, o investimento em tecnologias mais avançadas permitiu ao Brasil entrar na produção de couro para estofados e couros automotivos, dando início a uma nova era na indústria curtidora brasileira (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014).

A indústria brasileira de couro conta com mais de 300 plantas curtidoras, 2.800 indústrias de componentes para couros e calçados e 120 fábricas de máquinas e equipamentos, gerando mais de 42.000 empregos diretos e movimentando US\$ 3,5 bilhões por ano (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014). Além dos curtumes como unidades autônomas de negócio, tem-se observado uma verticalização dos frigoríficos atuando também como curtidores, sendo que a produção e a indústria de couros localizam-se principalmente no Sul e no Sudeste do país, com destaque para os Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014).

1.3 A problemática da ecogenotoxicidade dos corantes têxteis

A literatura científica conta com diferentes trabalhos que têm mostrado o potencial dos corantes têxteis em causar efeitos tóxicos à saúde humana e ao meio ambiente. A exposição humana a estes corantes pode ocorrer através do consumo de água contaminada ou do contato com a pele, com ou sem a geração de metabólitos ativos pela ação de microrganismos intestinais ou dérmicos (TSUBOY et al., 2007).

Dentre os corantes mais utilizados pelas indústrias têxteis estão os azoicos. Estes provêm de aminas aromáticas diazotizadas acopladas a uma amina ou fenol, com uma ou mais ligações azo (-N=N-) (apud CHEQUER et al., 2013). Considerando que existem mais de 3.000 diferentes azo corantes disponíveis, e que seus efeitos tóxicos estão intimamente relacionados com a natureza e a posição dos substituintes ligados ao grupo azo, há a necessidade de se realizar a avaliação da toxicidade de cada corante individualmente, tendo em vista que pequenas mudanças na molécula podem alterar drasticamente suas propriedades tóxicas (CHUNG; STEVENS; CERNIGLIA, 1992).

Para reforçar a importância e a visibilidade necessárias por esta área da Ciência em nossa sociedade, a Comunidade Europeia banuiu o uso de corantes a base de benzidina desde 2003 (UNIÃO EUROPEIA, 2002), já que estudos em trabalhadores expostos a este composto demonstraram que sua azo-redução no ser humano gera aminas aromáticas responsáveis por causar câncer de bexiga (GOLKA; KOPPS; MYSLAK, 2004). Porém, países como Brasil, Argentina e México não cessaram completamente a produção de alguns corantes a base de benzidina (GUARATINI; ZANONI, 2000). Essa amina aromática foi detectada em efluentes de indústrias têxteis brasileiras, confirmando que este composto ainda está presente nos processos de tingimento (MAZZO et al., 2006).

Ainda, o Regulamento nº 552/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho das Comunidades Europeias, relativo ao registro, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH), diz que todos os corantes azóicos sintetizados a partir de aminas aromáticas carcinogênicas devem ser banidos de curtumes e indústrias têxteis (UNIÃO EUROPEIA, 2009). O Regulamento classifica 22 aminas aromáticas como carcinogênicas em seu Anexo XVII, porém estudos inconclusivos e/ou ausentes na literatura ainda motivam a comunidade científica a continuar testando a toxicidade de corantes não-regulamentados (BRÜSCHWEILER et al., 2014).

No Estado de São Paulo, o controle da poluição está previsto na Lei nº 997/76, já devidamente regulamentada (SÃO PAULO, 1976). Outras exigências relativas aos serviços de água e esgoto, bem como à qualidade dos corpos d'água receptores estão descritas nas Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/05 (BRASIL, 2005) e nº 430/11 (BRASIL, 2011). Porém, não há legislação específica no Brasil para o descarte de corantes em efluentes de indústrias têxteis.

Por outro lado, o processo de tingimento é altamente poluidor, gerando entre 10 a 50 % de perda de corantes para o meio ambiente (VAIDYA; DATYE, 1982), além de utilizar entre 30 a 50 litros de água para a coloração de cada quilograma de fio, dependendo do tipo de corante utilizado (KANT, 2012). Assim, milhões de litros de água contaminada são devolvidos diariamente aos rios, já que o volume total de efluente líquido gerado pelas indústrias é similar ao total de água captada (PACHECO, 2005). Cabe lembrar que estes efluentes também são constituídos por sais, detergentes, surfactantes, metais e outros aditivos, o que torna o tratamento muito difícil (JADHAV et al., 2010).

O grupo de pesquisa envolvido no presente estudo participou do Projeto Temático da FAPESP intitulado "Avaliação da Ocorrência, Toxicidade/Genotoxicidade e Processos para Degradação de Corantes em Efluentes e Águas Superficiais" (Processo nº. 2008/10449-7), realizando um amplo estudo de diversos corantes, desde

sua ocorrência em amostras ambientais até a identificação dos efeitos tóxicos e determinação de seus mecanismos de ação, com especial destaque aos efeitos ecogenoticológicos. Dentro deste contexto, este grupo detectou a presença do corante *Acid Black 210* em amostras superficiais coletadas no Córrego do Liso, que recebe efluentes de um curtume localizado na cidade de São Sebastião do Paraíso (MG). Este corante é o principal composto utilizado para conferir cor preta a couros (ZHRIM; TIZAOUI; HILAL, 2010). Porém, não há dados suficientes sobre o potencial genotóxico deste corante na literatura científica, além de não haver estudos relacionados ao seu monitoramento em águas superficiais.

Um levantamento bibliográfico realizado em 15 de agosto de 2016 utilizando a base de dados *Web of Science*TM v.5.22.3 com o termo “*Acid Black 210*” apontou 20 artigos publicados. Destes, 4 artigos descrevem métodos de uso alternativo deste corante para que haja uma maior fixação do mesmo aos tecidos, diminuindo a quantidade descartada através dos efluentes, e 16 artigos estão relacionados ao tratamento do efluente para que haja a decomposição do corante, sendo que metade dos artigos apresenta como foco somente a descoloração das amostras e apenas um deles se preocupou em propor a via de degradação metabólica do corante *Acid Black 210* através da bactéria *Providencia* sp SRS82, seguido de estudos preliminares de toxicidade do corante e dos metabólitos encontrados (AGRAWAL et al., 2014).

Pesquisadores da Seção de Riscos Toxicológicos e Nutricionais do Departamento Federal de Saúde Pública da Suíça publicaram recentemente um artigo científico identificando aminas aromáticas de importância toxicológica não-regulamentadas geradas por clivagem de azo corantes utilizados em indústrias têxteis. Neste artigo, o *Acid Black 210* é citado como um dos corantes responsáveis pela formação de 4-nitroanilina, classificada como possível carcinógeno humano, e ácido 4-aminobenzeno sulfônico, classificado como possível causador de sensibilização por contato com a pele humana (BRÜSCHWEILER et al., 2014).

Em pesquisa realizada por Umbuzeiro et al. (2005), amostras coletadas no Ribeirão dos Cristais (SP) foram testadas para os corantes *Disperse Blue 373*, *Disperse Violet 93* e *Disperse Orange 37* utilizando as linhagens YG1041 derivadas de *Salmonella typhimurium* TA98, porém com superprodução de nitrorredutases e acetiltransferases. Estes três corantes são os componentes principais do produto comercial *Black Dye Commercial Pruduct* (BDCP), e apresentaram atividade mutagênica bem mais alta com a linhagem YG1041 em relação à sua parental, o que denota que a mutagenicidade ocorreu devido aos produtos gerados após a biotransformação enzimática. Análises químicas apontaram para a contribuição do *Disperse Blue 373* em 55 % para a atividade mutagênica observada no lodo da

estação de tratamento da água para consumo humano localizada a aproximadamente 6 Km do descarte de resíduos de corantes de uma indústria têxtil.

A literatura científica não descreve a contribuição do corante *Disperse Violet 93* para esta atividade, nem a avaliação do risco do seu uso pelas indústrias têxteis, já que havia a necessidade da purificação deste corante antes que novos estudos de toxicológicos fossem realizados. Esta purificação foi realizada recentemente pela Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (UNICAMP) (dados não divulgados até o momento). Assim, o presente estudo visa preencher a lacuna científica sobre a avaliação do risco do uso dos corantes *Acid Black 210* e *Disperse Violet 93* pelas indústrias têxteis.

1.4 Avaliação ecogenotóxica

Os ensaios ecotoxicológicos complementam as análises químicas comumente adotadas na monitoração da poluição ambiental com o objetivo de identificar e avaliar a toxicidade observada e os impactos ambientais (MA et al., 1999). A classificação destes ensaios geralmente se divide entre agudos e crônicos, diferenciando-se principalmente quanto à duração e às respostas mensuradas.

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos severos (mortalidade e imobilidade) sofridos pelos organismos expostos ao agente tóxico por um curto período de tempo, geralmente de 24 a 96 horas. Estes efeitos representam, no ambiente aquático, os acidentes ambientais ou lançamento de efluentes industriais sem tratamento. Em contrapartida, os ensaios de toxicidade crônica avaliam os efeitos decorrentes de exposições a concentrações subletais do contaminante por todo o (ou uma boa parte do) ciclo de vida do organismo. Estes efeitos possibilitam avaliar os efeitos de concentrações do agente tóxico que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que podem comprometer suas funções biológicas, como por exemplo, no caso do lançamento contínuo de efluentes tratados (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006; COSTA et al., 2008).

Diferentes organismos podem ser utilizados na avaliação da toxicidade. No entanto, é importante que haja seletividade e sensibilidade constantes ao agente tóxico, elevada disponibilidade e abundância, além de estabilidade genética, representatividade no seu nível trófico, importância ambiental e/ou comercial, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, e biologia conhecida. Dentre os organismos testes as bactérias, as algas, os crustáceos e os peixes são os mais utilizados (COSTA et al., 2008).

Os poluentes ambientais também podem causar alterações genéticas diretas e/ou indiretas nas populações, resultando em um processo denominado “microevolução devido à poluição”. As alterações diretas relacionam-se com o dano causado no material genético, como mutações ou rearranjos; já as alterações indiretas são resultados de modificações na variabilidade genética (apud GUARATINI et al., 2008).

Uma substância é dita genotóxica quando é capaz de interagir com o DNA diretamente ou após biotransformação, causando danos na estrutura e/ou função da molécula de DNA (WEISBURGER, 1999). Após o dano, a célula interrompe seu ciclo celular e tenta reparar a lesão através dos sistemas de reparo, presente em todos os organismos. Caso estes sistemas falhem, a célula pode ser conduzida à senescência, apoptose ou mutação, podendo iniciar o processo de carcinogênese (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008). Embora as mutações possam ocorrer espontaneamente, os agentes mutagênicos são capazes de acelerar ou aumentar seus surgimentos, com maior possibilidade de ocorrência de efeitos deletérios (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

As mutações podem ser cromossômicas ou gênicas. Nas primeiras, ocorrem alterações estruturais ou numéricas nos cromossomos. Já nas segundas ocorrem pequenas alterações na sequência do DNA, confinadas em um único gene, principalmente por substituições, adições ou deleções de pares de bases nitrogenadas (mutações de ponto) (PRESTON; HOFFMANN, 2012).

1.4.1 Avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa

Um recente estudo bibliométrico realizado pela base de dados Pubmed com temas relacionados ao “*Comet assay*” entre os anos 1990 e 2013 apontou a publicação de 509 artigos por autores brasileiros, dentre os 7.674 artigos totais encontrados. Ainda, uma análise comparativa entre palavras-chave possibilitou visualizar a importância deste ensaio para a área de “Saúde Pública e Ambiental” através da observação de alguns termos relacionados, como “Contaminante de Águas” (338 artigos) e “Monitoramento Ambiental” (299 artigos) (NERI et al., 2015), focos do presente estudo.

O Ensaio do Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas, como por exemplo o baixo custo, a alta sensibilidade e a fácil execução, além da flexibilidade quanto aos tipos de células que podem ser utilizadas. Este ensaio não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que podem resultar em mutação (GONTIJO; TICE, 2003).

O comportamento do DNA nas células está relacionado à sua organização dentro do núcleo. Para ser compactado, após o enovelamento com proteínas histônicas, o DNA forma alças de 5-200 Kpb que são aderidas a uma rede protéica ou “matriz celular” (RAZIN; GROMOVA; IAROVAIA, 1995; COOK; BRAZELL, 1976). Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) forem extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo, designada como “nucleoide” (COOK; BRAZELL, 1976). Dentre as poucas proteínas que resistem a esta extração estão as da matriz celular. Portanto, por definição, o nucleoide é uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA a estrutura do nucleoide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (VOGELSTEIN; PARDOLL; COFFEY, 1980; COOK; BRAZELL, 1976).

A aparência de cada nucleoide quando submetido à eletroforese, ou seja, com seu DNA danificado migrando em direção ao ânodo, levou Olive (1989) a sugerir o nome *Comet assay* (Ensaio do Cometa) para identificar o teste que ficou também conhecido pelo nome *Single-Cell Gel (SCG) Assay*. Neste ensaio, para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: “cabeça” e “cauda”. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentariam cauda, permanecendo similares aos nucleoides, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores. Atualmente, o tamanho, intensidade de fluorescência, aspecto e outras características dos cometas são mensurados visualmente por microscopia e *softwares* específicos de análise de imagem (TICE et al., 2000).

Singh et al. (1988) e Olive, Banáth e Durand (1990) introduziram, independente e paralelamente, algumas modificações no protocolo do Ensaio do Cometa, incluindo a alcalinização da solução de lise e de eletroforese. Essas modificações possibilitaram a identificação de quebras de fita simples e sítios álcali lábeis no DNA, além das quebras de fita dupla, já visualizadas com os protocolos de Östling e Johanson (1984; 1987). Esse aumento de sensibilidade do ensaio foi atribuído ao fato da fita dupla de DNA, uma vez exposta a pH extremamente alcalino (pH > 12), sofrer desnaturação, isto é, separar-se em fitas simples de DNA (RYDBERG, 1980).

1.4.2 Avaliação da mutagenicidade através do Ensaio com *Salmonella typhimurium*

O ensaio de mutação reversa empregando *Salmonella typhimurium*, também conhecido como Teste de Ames, é capaz de detectar mutações gênicas causadas, por exemplo, por substituições, adições ou deleções de bases nitrogenadas. Esse ensaio é mundialmente utilizado para determinar o potencial mutagênico de substâncias químicas e misturas devido à sua rápida resposta. Outra vantagem é o alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (61 % de acordo com o estudo realizado pelo *National Toxicology Program* para 446 compostos) (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Outra aplicação deste teste inclui a análise de amostras ambientais, como ar, água, resíduos, solos e sedimentos (JARVIS et al., 1996).

As linhagens de *Salmonella* utilizadas no Teste de Ames são capazes de produzir azorredutases e nitrorredutases (PRIVAL; MITCHELL, 1982), além de apresentarem mutações nos genes responsáveis pela biossíntese de histidina e, conseqüentemente, não conseguem sintetizar esse aminoácido. Assim, uma nova mutação é necessária para que consigam crescer na ausência de histidina, o que caracteriza a exposição da bactéria a agentes mutagênicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Cada linhagem utilizada apresenta uma sensibilidade específica para diferentes classes de mutágenos. Desse modo, a combinação delas permite identificar diversos agentes que podem interferir com o DNA (BENIGNI; BOSSA, 2011). As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para a triagem de amostras, sendo capazes de detectar compostos que causam o deslocamento do quadro de leitura e a substituição de pares de bases, respectivamente (MARON; AMES, 1983).

Alguns compostos precisam ser metabolizados para apresentarem atividade mutagênica. Em muitos seres vivos, incluindo o ser humano, o sistema metabólico de oxidação Citocromo P450 (CYP) realiza o processo de biotransformação de uma ampla gama de substâncias, gerando outras que, por sua vez, podem reagir com o DNA. Logo, também é importante mimetizar esse sistema nos ensaios de mutagenicidade através da adição de um sistema de metabolização exógena (mistura S9). Essa solução é constituída por um homogenato de células de fígado de rato pré tratado com mistura de bifenilas policlorinadas (Aroclor 1254), que induz o aumento da expressão de enzimas relacionadas ao CYP e seus cofatores (MARON; AMES, 1983).

1.4.3 Avaliação do potencial embrio-tóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

O *zebrafish*/paulistinha (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce que atingem no máximo 5 centímetros de tamanho, sendo nativo de rios do sul da Ásia, pertencente à família dos Cyprinidae e à ordem dos Cypriniformes. Sua característica mais marcante é o padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo (Figura 2). É uma espécie que possui nadadeiras anal e caudal e, em geral, os machos são mais delgados e escuros do que as fêmeas (LAWRENCE, 2007; SPENCE et al., 2008).

Dentre as características que facilitam seu cultivo em laboratórios de pesquisa e permitem a realização de estudos (eco)toxicológicos estão: tamanho pequeno, facilidade de manutenção, produção de grande número de embriões com desenvolvimento externo ao útero da fêmea, transparência dos ovos e larvas (possibilitando acompanhar seu desenvolvimento e observar a presença de má-formações em tempo real), curto ciclo de reprodução e alcance da maturidade sexual após poucos meses do nascimento dos embriões, além da caracterização completa de seus genoma e alta similaridade genética aos humanos (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ et al., 2008).

Quando os genes do *zebrafish* são comparados e relacionados aos dos humanos, observa-se que 71,4 % dos genes humanos possuem pelo menos um ortólogo pisco, e de maneira recíproca, 69 % dos genes do *zebrafish* possuem pelo menos um ortólogo humano. Ainda, existem casos onde não há um gene ortólogo clássico entre estas espécies, porém ambos possuem proteínas codificadas para o exercício de funções similares através de sequências genômicas diferentes, como ocorre com a oncostatina-M e a interleucina-6 (HOWE et al., 2013).

Figura 2 – Morfologia externa do *zebrafish*, ressaltando seu padrão típico de listras pretas e brancas ao longo do corpo.



Fonte: <http://oregonstate.edu/terra/wp-content/uploads/2013/07/Zebrafish1-small.jpg>

Os testes de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio* surgiram da necessidade de desenvolver experimentos alternativos aos testes com peixes adultos após as discussões éticas que envolvem a experimentação animal e o sofrimento e a dor causados a estes quando utilizados para fins científicos (NAGEL, 2002). A diretiva internacional 86-609-CEE (UNIÃO EUROPEIA, 1986) já previa a necessidade de implantação de métodos alternativos de experimentação animal, seguindo o conceito da “política dos 3 Rs” (da inicial em inglês para Redução [*Reduction*] do número de animais, Refinamento [*Refinement*] dos ensaios, e Substituição [*Replacement*] dos testes com animais por modelos alternativos), descrita por Russell e Burch (1959). Esta foi consolidada com a diretiva 2010/63/EU, após ser rediscutida por Balls e Straughan (1996), considerando que os estágios iniciais do desenvolvimento do *zebrafish* não precisam de regulamentação especial uma vez que embriões e larvas que não alcançaram a alimentação exógena não são considerados animais (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

Para uma maior compreensão do alcance e da validade dos testes com embriões de *zebrafish* recomendo a leitura criteriosa e na íntegra dos artigos “DarT: The embryo test with zebrafish *Danio rerio* – A general in ecotoxicology and toxicology” (NAGEL, 2002) e “OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing” (BUSQUET et al., 2014).

1.5 Avaliação da permeabilidade através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

O Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) é simples e rápido quando o objetivo é mensurar a permeabilidade passiva de um composto na ausência de sistemas de efluxo, e se tornou uma importante ferramenta para a predição da permeabilidade *in vivo* de compostos para a avaliação de seus mecanismos de transporte (CHEN et al., 2008).

Inicialmente formulado por Kansy, Senner e Gubernator (1998), este ensaio consistia de uma membrana artificial preparada pela impregnação de filtros porosos com uma solução de lipídeos e outros constituintes das membranas biológicas. No método original a solução lipídica consistia de 1-20 % de lecitina em solução orgânica (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998). Posteriormente, foram desenvolvidos os métodos biomimético, de mergulho duplo, e baseado em solução lipídica, formando membranas artificiais através da utilização de soluções lipídicas (CHEN et al., 2008).

O desenvolvimento de uma membrana artificial estável pré-revestida e com possibilidade de armazenamento pela empresa Corning permitiu uma simulação de permeabilidade passiva próxima à de membranas biológicas e com alto valor preditivo para absorção oral humana (SHANLER et al., 2013).

1.6 Avaliação do risco

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), a avaliação ecológica do risco é o processo de avaliar como o meio ambiente pode ser impactado pela exposição de um ou mais “estressores”, sejam eles substâncias químicas, mudanças climáticas, doenças ou espécies invasivas (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2016). A avaliação do risco envolve, basicamente, os processos de planejamento e definição dos objetivos, em conjunto com a pesquisa dos materiais disponíveis na literatura, a formulação do problema (fase 1), onde as informações disponíveis irão determinar quais são os riscos e o que precisa ser protegido no meio ambiente, a análise das informações disponíveis (fase 2), onde são determinadas que plantas ou animais podem ser expostos, em qual grau ocorre essa exposição, e se há a possibilidade de ocorrer efeitos ecológicos prejudiciais, e por fim a caracterização do risco (fase 3), incluindo a estimativa e a descrição do risco (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2016).

A avaliação do risco pode ser realizada através de uma infinidade de métodos e modelos, que podem ser classificados entre “padrões” e “não-padronizados”. Os primeiros estão relacionados aos métodos descritos por organizações internacionais oficiais ou por agências de harmonização/padronização nacionais, como a OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), US EPA (*United States Environmental Protection Agency*), ASTM (*American Society for Testing and Materials*), AFNOR (*Association Française de Normalisation*) e ISO (*International Organization for Standardization*) (ÅGERSTRAND; BREITHOLTZ; RUDÉN, 2011).

Os estudos de ecotoxicologia publicados na literatura científica contribuem para que avaliadores do risco tenham os conhecimentos necessários para uma adequada condução de seus trabalhos. Porém, a avaliação da confiabilidade e da relevância dos dados está sujeita à análise de cada avaliador. Um dos métodos mais recomendados (e o método de escolha de muitas agências europeias) é o descrito por Klimisch, Andreae e Tillmann (1997) (MOERMOND et al., 2016), ainda que seja um método inespecífico, não contenha alguns critérios essenciais para uma avaliação completa, e nem indique precisamente em quais trabalhos científicos há confiabilidade e relevância, resultando na livre interpretação de cada avaliador. Já a EPA desenvolveu

recentemente o seu próprio guia para a realização de avaliações do risco (MOERMOND et al., 2016).

Em algumas áreas da Ciência já existem recomendações sistemáticas bem descritas, como o *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) para a Epidemiologia, o *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) para os estudos de toxicidade *in vivo*, e o *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME) para os estudos envolvendo análises por *microarray* (MOERMOND et al., 2016).

Para os estudos de ecotoxicidade foi reportado recentemente o Projeto CRED (*Criteria for Reporting and Evaluating Ecotoxicity Data*), com o objetivo de aumentar a reprodutibilidade, a consistência e a transparência dos estudos de ecotoxicidade quanto às suas confiabilidades e relevâncias (MOERMOND et al., 2016). O Projeto CRED foi direcionado inicialmente aos estudos de ecotoxicidade aquática, porém pode ser adaptado para as demais áreas da Ciência quando necessário. As peculiaridades do método estão descritas na sequência desta Tese, na seção Material e Métodos (item 3.6), já que foi o método de escolha para a avaliação do risco ecogenotóxicológico do corante *Acid Black 210* realizada no presente estudo.

Ainda, os autores trazem 50 diferentes critérios de recomendação divididos em 6 categorias (informações gerais, desenho do estudo, substância testada, organismo testado, condições de exposição, e desenho estatístico/resposta biológica) para servir de guia aos pesquisadores que pretendem contribuir com dados experimentais de ecotoxicologia aquática (MOERMOND et al., 2016).

“A verdade pode ser intrigante. Pode dar algum trabalho lidar com ela. Pode ser contraintuitiva. Ela pode contradizer preconceitos profundamente enraizados. Pode não se coadunar com o que queremos desesperadamente que seja verdade. Mas nossas preferências não determinam o que é verdade.”

Carl Sagan

Conclusões

-VI-

CONCLUSÕES

O corante *Acid Black 210* não apresentou genotoxicidade em células HepG2, nem mutagenicidade em linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100 mesmo na presença de metabolização. Ainda, não apresentou toxicidade morfofisiológica em embriões de *zebrafish*. Pelos resultados obtidos e pela avaliação do risco do uso do *Acid Black 210* pelas indústrias têxteis, não há indícios de que este corante apresente ecogenotoxicidade que justifique sua retirada do mercado ou legislação específica. Este corante pode ser considerado seguro à luz dos conhecimentos atuais.

Por outro lado, o corante *Disperse Violet 93* apresentou toxicidade morfofisiológica em embriões de *zebrafish*. Considerando que na literatura científica também consta sua mutagenicidade em linhagem de *S. typhimurium* YG1041, este corante necessita de avaliações nos demais níveis tróficos para que uma avaliação do risco seja realizada.

Estes resultados ressaltam a importância da realização de estudos toxicológicos visando fornecer subsídios para a realização de avaliações do risco do uso de corantes, já que estes se encontram em exposição constante aos seres vivos e ao meio ambiente.

“Ninguém se torna iluminado por imaginar figuras de luz, mas sim por tornar consciente a escuridão.”

Carl Jung

Referências

- ÅGERSTRAND, M.; BREITHOLTZ, M. RUDÉN, C. Comparison of four different methods for reliability evaluation of ecotoxicity data: A case study of non-standard test data used in environmental risk assessments of pharmaceutical substances. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, n. 17, 2011
- AGRAWAL, S.; TIPRE, D.; PATEL, B.; DAVE, S. Optimization of triazo Acid Black 210 dye degradation by *Providencia* sp. SRS82 and elucidation of degradation pathway. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 110-119, 2014
- ALAM, M. Z.; AHMAD, S.; MALIK, A.; AHMAD, M. Mutagenicity and genotoxicity of tannery effluents used for irrigation at Kanpur, India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1620-1628, 2010
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA, 2012. **Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Disponível em: <<https://www.standardmethods.org/>>
- ANLIKER, R. Ecotoxicology of dyestuffs – Joint effort by industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 3, p. 59-74, 1979
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Rima Editora, p. 117-152, 2006
- ABMANN, N.; EMMRICH, M.; KAMPF, G.; KAISER, M. Genotoxic activity of important nitrobenzenes and nitroanilines in the Ames test and their structure-activity relationship. **Mutation Research**, v. 395, p. 139-144, 1997
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). Disponível em: <www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/sobre-o-produto>. Acesso em: 29 jul. 2016
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). Disponível em: <www.abit.org.br/Abit.aspx#4>. Acesso em: 27 mar. 2015
- BAFANA, A.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: Past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, p. 350-370, 2011
- BALLS, M.; STRAUGHAN, D. W. The three Rs of Russell & Burch and the testing of biological products. **Developments in Biological Standardization**, v. 86, p. 11-18, 1996
- BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 2507-2536, 2011
- BERNSTEIN, L.; 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.
- BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Brasília**, 2005

BRASIL. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Brasília**, 2011

BRAZILIAN LEATHER BOOK, 147 p., **Centro das Indústrias de Curtume do Brasil (CICB)**, 2014, disponível em: <www.brazilianleather.com.br>

BRÜSCHWEILER, B. J.; KÜNG, S.; BÜRGI, D.; MURALT, L.; NYFELER, E. Identification of non-regulated aromatic amines of toxicological concern which can be cleaved from azo dyes used in clothing textiles. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 263-272, 2014

BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T.; CARR, G. J.; CENIJN, P.; FOCHTMAN, P.; GOURMELON, A.; HÜBLER, N.; KLEENSANG, A.; KNÖBEL, M.; KUSSATZ, C.; LEGLER, J.; LILLICRAP, A.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; POLLEICHTNER, C.; RZODECZKO, H.; SALINAS, E.; SCHNEIDER, K. E.; SCHOLZ, S.; BRANDHOF, E. J. V. D.; VEN, L. T. M. V. D.; WALTER-ROHDE, S.; WEIGT, S.; WITTERS, H.; HALDER, M. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 469-511, 2014

CESILA, C. A. **Avaliação do potencial mutagênico de corantes têxteis por meio do ensaio do micronúcleo**. Ribeirão Preto, 89 p., Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Toxicologia, 2015

CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C. L.; BALIMANE, P. V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 1511-1520, 2008

CHEQUER, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 676, p. 83-86, 2009

CHEQUER, F. M. D.; OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. Textile dyes: Dyeing process and environmental impact. In: GUNAY, M. **Eco-friendly textile dyeing and finishing**. Rijeka: InTech, p. 151-176, 2013

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

CICB – CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL. Disponível em: <www.cicb.org.br>. Acesso em: 25 abr 2016

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

- COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Conformations constrains in nuclear DNA. **Journal of Cell Science**, v. 22, p. 287-302, 1976.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008
- FERRAZ, E. R. A.; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 628-633, 2011
- FERRAZ, E. R. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F. M. D.; ZANONI, M. V. B.; DORTA, D. J.; OLIVEIRA, D. P. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay and *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 489-497, 2011
- GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 203-210, 2004
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do Cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 247-279, 2003
- GUARATINI, T.; CARDOZO, K. H. M.; PAVANELLI, D. D.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Ecotoxicologia. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 125-141, 2008
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000
- HELLMAN, B.; VAGHEF, H.; BOSTRÖM, B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research / DNA Repair**, v. 336, p. 123-131, 1995
- HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. R.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; COLLINS, J. E.; HUMPHRAY, S.; MCLAREN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; SEALY, I.; CACCAMO, M.; CHURCHER, C.; SCOTT, C.; BARRETT, J. C.; KOCH, R.; RAUCH, G. J.; WHITE, S.; CHOW, W.; KILIAN, B.; QUINTAIS, L. T.; GUERRA-ASSUNÇÃO, J. A.; ZHOU, Y.; GU, Y.; YEN, J.; VOGEL, J. H.; EYRE, Y.; REDMOND, S.; BANERJEE, R.; CHI, J.; FU, B.; LANGLEY, E.; MAGUIRE, S. F.; LAIRD, G.K.; LLOYD, D.; KENYON, E.; DONALDSON, S.; SEHRA, H.; ALMEIDA-KING, J.; LOVELAND, K.; TREVANION, S.; JONES, M.; QUAIL, M.; WILLEY, D.; HUNT, A.; BURTON, J.; SIMS, S.; MCLAY, K.; PLUMB, B.; DAVIS, J.; CLEE, C.; OLIVER, K.; CLARK, R.; RIDDLE, C.; ELLIOT, D.; THREADGOLD, G.; HARDEN, G.; WARE, D.; BEGUM, S.; MORTIMORE, B.; KERRY, G.; HEALTH, P.; PHILLIMORE, B.; TRACEY, A.; CORBY, B.; DUNN, M.; JOHNSON, C.; WOOD, J.; CLARK, S.; PELAN, S.; GRIFFITHS, G.; SMITH, M.; GLITHERO, R.; HOWDEN, P.; BARKER, N.; LLOYD, C.; STEVENS, C.; HARLEY, J.; HOLT, K.; PANAGIOTIDIS, G.; LOVELL, J.; BEASLEY, H.; HENDERSON, C.; GORDON, D.; AUGER, K.; WRIGHT, D.; COLLINS, J.; RAISEN, C.; DYER, L.; LEUNG, K.; ROBERTSON, L.; AMBRIDGE, K.; LEONGAMORNERT, D.; MCGUIRE, S.; GILDERTHROP, R.; GRIFFITHS, C.; MANTHRAVADI, D.; NICHOL, S.; BARKER, G.; WHITEHEAD, S.; KAY, M.; BROWN, J.; MURNANE, C.; GRAY, E.; HUMPHRIES, M.; SYCAMORE, N.; BARKER, D.;

SAUNDERS, D.; WALLIS, J.; BABBAGE, A.; HAMMOND, S.; MASHREGHI-MOHAMMADI, M.; BARR, L.; MARTIN, S.; WRAY, P.; ELLINGTON, A.; MATTHEWS, N.; ELLWOOD, M.; WOODMANSEY, R.; CLARK, G.; COOPER, J.; TROMANS, A.; GRAFHAM, D.; SKUCE, C.; PANDIAN, R.; ANDREWS, R.; HARRISON, E.; KIMBERLEY, A.; GARNETT, J.; FOSKER, N.; HALL, R.; GARNER, P.; KELLY, D.; BIRD, C.; PALMER, S.; GEHRING, I.; BERGER, A.; DOOLEY, C. M.; ERSAN-ÜRÜN, Z.; ESER, C.; GEIGER, H.; GEISLER, M.; KAROTKI, L.; KIRN, A.; KONANTZ, J.; KONANTZ, M.; OBERLÄNDER, M.; RUDOLPH-GEIGER, S.; TEUCKE, M.; LANZ, C.; RADDATZ, G.; OSOEGAWA, K.; ZHU, B.; RAPP, A.; WIDAA, S.; LANGFORD, C.; YANG, F.; SCHUSTER, S.C.; CARTER, N. P.; HARROW, J.; NING, Z.; HERRERO, J.; SEARLE, S. M.; ENRIGHT, A.; GEISLER, R.; PLASTERK, R. H.; LEE, C.; WESTERFIELD, M.; DE JONG, P. J.; ZON, L. I.; POSTLETHWAIT, J. H.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; HUBBARD, T. J.; ROEST CROLIUS, H.; ROGERS, J.; STEMPEL, D. L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498-503, 2013

INAMI, K.; OKAZAWA, M.; MOCHIZUKI, M. Mutagenicity of aromatic amines and amides with chemical models for cytochrome P450 in Ames assay. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 986-991, 2009

JADHAV, J. P.; KALYANI, D. C.; TELKE, A. A.; PHUGARE, S. S.; GOVINDWAR, S. P. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 165-173, 2010

JARVIS, A. S.; 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**, v. 33, p. 193-200, 1996

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 1007-1010, 1998

KANT, R. Textile dyeing industry: An environmental hazard. **Natural Science**, v. 4, p. 22-26, 2012

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic-development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995

KIRKLAND, D.; BALLANTYNE, M.; HARLFINGER, S.; WILL, O.; JAHNEL, U.; KRAUS, A.; VAN DORP, C. Further investigations into the genotoxicity of 2,6-xylydine and one of its key metabolites. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 151-159, 2012

KLIMISCH, H. J.; ANDREAE, M.; TILLMANN, U. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 1-5, 1997

LAMASON, R. L.; MOHIDEEN, M. A. P. K.; MEST, J. R.; WONG, A. C.; NORTON, H. L.; AROS, M. C.; JURYNEC, M. J.; MAO, X.; HUMPHREVILLE, V. R.; HUMBERT, J. E.; SINHA, S.; MOORE, J. L.; JAGADEESWARAN, P.; ZHAO, W.; NING, G.; MAKALOWSKA, I.; MCKEIGUE, P. M.; O'DONNELL, D.; KITTLES, R.; PARRA, E. J.; MANGINI, N. J.; GRUNWALD, D. J.; SHRIVER, M. D.; CANFIELD, V. A.; CHENG, K.

- C. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. **Science**, v. 310, p. 1782-1786, 2005
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1-20, 2007
- LEMOS, A. O.; OLIVEIRA, N. C. D.; LEMOS, C. T. *In vitro* micronuclei tests to evaluate the genotoxicity of surface water under the influence of tanneries. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 761-766, 2011
- LOPES, M. R. S.; MARTINEZ, S. T.; CHAVES, V. C.; ROCHA, A. S. R.; AMARANTE, L. Determinação por HPLC de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 954-956, 2007
- MA, M.; TONG, Z.; WANG, Z.; ZHU, M. Acute toxicity bioassay using the freshwater luminescent bacterium *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov.-Q67. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 247-253, 1999
- MACHADO-SANTELLI, G. M.; SIVIERO, F. Mutagênese e carcinogênese. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 81-99, 2008
- MANJUNATHA, B.; WEI-BING, P.; KE-CHUN, L.; MARIGOUDAR, S. R.; XI-QIANG, C.; XI-MIN, W.; XUE, W. The effects of henna (hair dye) on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 10361-10367, 2014
- MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M.; MENEGÁRIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Sciences and Pollution Research**, v. 22, p. 1399-1407, 2015
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALLAGUTI, M. I.; MARIN-MORALES, M. A. Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the *in vitro* Comet assay. **Cytologia**, v. 68, p. 395-401, 2003
- MAZZO, T. M.; SACZK, A. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. Analysis of aromatic amines in surface waters receiving wastewater from a textile industry by liquid chromatographic with electrochemical detection. **Analytical Letters**, v. 39, p. 2671-2685, 2006
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/EFABF603/Ofi_08_2008DIQUAIBAM_A_Completo.pdf>
- MITTEREGGER JR., H.; SILVA, J.; ARENZON, A.; PORTELA, C. S.; FERREIRA, I. C. F. S.; HENRIQUES, J. A. P. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. **Chemosphere**, v. 67, p. 1211-1217, 2007

MOERMOND, C. T. A.; KASE, R.; KORKARIC, M.; ÅGERSTRAND, M. CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, p. 1-13, 2016

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

MOTULSKY, H. GraphPad Prism® Version 5.0: Statistics Guide. **GraphPad Software Incorporation**, 2007

MURRELL, J. N. The **theory of the electronic spectra of organic molecules**. Londres: Chapman and Hall, 1963

NAGEL, R. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – A general model in ecotoxicology and toxicology. **Altex**, v. 19, s. 1, 2002

NERI, M.; MILAZZO, D.; UGOLINI, D.; MILIC, M.; CAMPOLONGO, A.; PASQUALETTI, P.; BONASSI, S. Worldwide interest in the comet assay: A bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30, p. 155-163, 2015

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing Chemicals, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **Guideline 236**, 2013

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

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v. 117, p. 79-92, 1989

OLIVEIRA, G. A. R. **Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis**. Ribeirão Preto, 98 p., Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Toxicologia, 2013

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. **International Journal of Radiation Biology**, v. 52, p. 683-691, 1987

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

PACHECO, J. W. F. **Curtumes**. São Paulo: CETESB, 76 p., 2005, disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br>

PETIT, C.; BUJARD, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; CRETOON, S.; HOURIET, J.; CHRISTEN, P.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J. L. Prediction of the passive intestinal absorption of medicinal plant extract constituents with the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). **Planda Medica**, v. 82, p. 424-431, 2016

PFIZER, **Fenazopiridina**. Maria Rita Maniezi. Cotia-SP, 2008. Bula de remédio

- PRESTON, R. J.; HOFFMAN, G. R. Toxicologia genética. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**. 2 ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, p. 123-135, 2012
- PRIVAL, M. J.; MITCHELL, V. D. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. **Mutation Research**, v. 97, p. 103-116, 1982
- RAJAGURU, P.; KALPANA, R.; HEMA, A.; SUBA, S.; BASKARASETHUPATHI, B.; KUMAR, P. A.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 316-322, 2001
- RAZIN, S. V.; GROMOVA, I. I., IAROVAIA, O. V. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: New approaches to clarify the old questions. In: **Nuclear matrix: Structural and functional organization**. California: Academic Press, p. 405-448, 1995
- RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. C.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, p. 21-27, 2003
- ROCHA, O. P.; CESILA, C. A.; CHRISTOVAM, E. M.; BARROS, S. B.; ZANONI, M. V. OLIVEIRA, D. P. Ecotoxicological risk assessment of the "Acid Black 210" dye. **Toxicology**, *in press*, 2016
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London, Methuen & Co., 1959
- RYDBERG, B. Detection of induced DNA strand breaks with improved sensitivity in human cells. **Radiation Research**, v. 81, p. 492-495, 1980
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-223, 2003
- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. KB-R7943 Mesylate (CAS 182004-65-5), 2015, disponível em: <www.scbt.com/pt/datasheet-202681-kb-r7943-mesylate.html>. Acesso em: 20 mar. 2015
- SÃO PAULO. Lei nº 997, de 31 de maio de 1976. Dispõe sobre o Controle da Poluição do Meio Ambiente. **São Paulo**, 1976
- SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.; VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – Applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 15, p. 394-404, 2008
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988
- SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 89, p. 13-24, 2008

- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000
- TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P.; MANTOVANI, M. S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G. A.; RIBEIRO, L. R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007
- UMBUZEIRO, G. D. 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, 2005
- UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 81-112, 2003
- UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 02/61/EC, de 19 de julho de 2002. Sobre a restrição na venda e uso de substâncias e preparações (azocorantes). **União Europeia**, 2002
- UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 10/63/EU, de 22 de setembro de 2010. Sobre a proteção dos animais utilizados para propósitos científicos. **União Europeia**, 2010
- UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 86/609/CEE, de 24 de novembro de 1986. Relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares, e administrativas dos Estados-membros respeitantes à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos. **Bruxelas**, 1986
- UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) n° 552, de 22 de junho de 2009. Altera o Regulamento (CE) n° 1.907/06 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo ao registro, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH). **Suíça**, 2009
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Disponível em: <www.epa.gov/risk>. Acesso em: 24 jul 2016
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA, 1994. **The Water Quality Standards Handbook**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/wqs-tech/water-quality-standards-handbook>>
- VACCHI, F. I.; ALBUQUERQUE, A. F.; VENDEMIATTI, J. A.; MORALES, D. A.; ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S.; ZOCCOLO, G. J.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 302-309, 2013
- VAIDYA, A. A.; DATYE, K. V. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. **Colourage**, v. 14, p. 3-10, 1982
- VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D. M.; COFFEY, D. S. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. **Cell**, n. 22, p. 79-85, 1980

WALTON, R. P.; LAWSON, E. H. Pharmacology and toxicology of the azo dye, phenyl-azo-alpha-diaminopyridine (pyridium). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 51, p. 200-216, 1934

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

WORLD DYES & ORGANIC PIGMENTS. Disponível em: <
<http://www.prnewswire.com/news-releases/world-dyes--organic-pigments-market-300113681.html>>. Acesso em: 27 out 2015

ZHRIM, A. Y.; TIZAOUI, C.; HILAL, N. Evaluation of several commercial synthetic polymers as flocculant aids for removal of highly concentrated C.I. Acid Black 210 dye. **Journal of Hazard Materials**, v. 182, p. 624-630, 2010

ZANONI, T. B. **Avaliação do perfil de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes Basic Red 51, Basic Yellow 57 e p-fenilenodiamina usados na tintura de cabelo em células da pele**. Ribeirão Preto, 168 p., Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Toxicologia, 2014