

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos
azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**

Farah Maria Drumond Chequer

Ribeirão Preto

2008

RESUMO

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13.** 2008. 124f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Atualmente, a utilização de azo corantes pelas indústrias de tingimento constitui um problema ambiental e de saúde, considerando o lançamento de quantidades elevadas para o meio ambiente e a falta de dados toxicológicos dos corantes disponíveis para as indústrias. Vários estudos têm demonstrado o potencial genotóxico de diversos corantes azóicos, porém para os corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e o Disperse Red 13, não foram encontrados dados na literatura relativos à sua capacidade de dano ao material genético. Considerando que esses corantes são empregados em processos de tingimento no Brasil, esse trabalho teve como objetivo a avaliação de sua atividade mutagênica, utilizando o teste de micronúcleo (MN) em linfócitos humanos e em células HepG2. Os resultados obtidos no teste com linfócitos, demonstram que na menor concentração testada (0,2 µg/mL), o número de micronúcleos presentes foi semelhante ao controle negativo, mas esse número aumenta à medida que eleva-se a concentração. No entanto, a partir da concentração de 1,0 µg/mL, este valor começa a decair. Isso provavelmente se deve à citotoxicidade dos corantes, levando à morte celular ou redução da divisão celular e, conseqüentemente, não há a formação de micronúcleo. Embora o perfil de mutagenicidade dos três corantes seja semelhante, o corante Disperse Red 13 parece ter maior potencial de dano sobre os linfócitos em relação aos demais, seguido pelo Disperse Red 1 e Disperse Orange 1, respectivamente. Os resultados obtidos para o teste de MN em células HepG2 foram semelhantes aos obtidos no teste feito em linfócitos. O aumento do número de micronúcleos em relação ao aumento da concentração dos corantes, ocorreu até o limite de 2,0 µg/mL em células HepG2, excetuando-se o corante Disperse Red 13, para o qual o limite foi de 1,0 µg/mL. E a partir desses pontos, considerados como limites, ocorreu uma redução no número de MN. Para este sistema celular, os três corantes parecem ter potencial mutagênico bastante semelhante. Portanto, a análise dos resultados mostrou que os corantes Disperse Red 13, Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 são mutagênicos para sistemas celulares diferentes. Foi também avaliado Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese (IPBC), que permite a avaliação de toxicidade celular ou atraso no ciclo celular por meio da determinação da proliferação celular nas culturas. Porém, neste estudo não foram observadas diferenças estatísticas entre o controle negativo e as concentrações testadas. Nossos resultados confirmam que os azo corantes constituem uma importante classe de contaminantes ambientais e devem ser avaliados e utilizados de forma cautelosa.

Palavras-chave: Disperse Red 1, Disperse Red 13, Disperse Orange 1, Micronúcleos, Linfócitos Humanos, Células HepG2.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Corantes e a indústria têxtil

Os corantes e pigmentos orgânicos podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando aplicadas a um material, lhe conferem cor (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA [ABIQUIM], 2006).

Há mais de 20 mil anos, o homem utiliza as cores, sendo o Negro-de-Fumo (Carbon Black) o primeiro corante de que se tem conhecimento. Por volta de 3.000 a.C., surgiram alguns corantes inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio. No Período Glacial, os caçadores utilizavam fuligem e ocre para pintar as paredes das cavernas. Com o tempo, muitos corantes naturais foram sendo descobertos. Na Roma Antiga, a cor púrpura, obtida de um molusco marinho chamado Murex, era símbolo de riqueza e distinção, sendo utilizada nas vestes reais. Outro corante muito utilizado era o índigo, conhecido desde os egípcios até os bretões, era extraído da planta *Isatis tinctoria* e ainda hoje é utilizado para dar coloração ao jeans (ABIQUIM, 2006).

O primeiro corante orgânico sintético foi o Mauve, obtido em 1856 por William H. Perkin, através da oxidação da fenilamina (anilina) com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). A partir daí, diversos corantes sintéticos foram desenvolvidos. No fim do século XIX, foram estabelecidas fábricas de corantes sintéticos na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça, que forneciam o insumo para as indústrias de tecidos, couro e papel. Já mais recentemente, nos anos de 1994 e 1995, grandes corporações migraram para países asiáticos, como China, Índia e Indonésia, implantando unidades próprias ou em parcerias com fabricantes locais (ABIQUIM, 2006).

Os corantes sintéticos são usados extensivamente na indústria têxtil, impressão de papel, fotografia, indústrias farmacêuticas e alimentícias e produtos a base de petróleo (RAJAGURU et al., 1999).

O setor têxtil representa um dos ramos industriais mais antigos do país e do mundo, sendo um dos segmentos precursores da Revolução Industrial ocorrida no período de 1780 a 1840. Até 1950, este ramo industrial não apresentou grande evolução do ponto de vista tecnológico. Após tal década, porém, e pela incorporação de outras áreas como a química, mudanças significativas ocorreram, tanto no âmbito

produtivo, como no comercial. Isso foi devido, principalmente, a fatores, como: o acirramento da concorrência, a incorporação de novos métodos (*just-in-time*) e de novas tecnologias (microeletrônica) no processo produtivo, o desenvolvimento de novos produtos (fibras sintéticas) e a segmentação de cadeia (migração para países com custos de produção mais baixos) (FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS [FINEP], 2006). No Brasil, este setor é de grande importância, sendo o sétimo parque industrial do mundo e um dos que mais utiliza água: cerca de 150 litros por quilo de tecido produzido (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TEXTIL E DE CONFECÇÕES [ABIT], 2005).

O Processo de Tingimento das Fibras

Conforme já mencionado, a utilização de corantes e pigmentos iniciou há milhares de anos, mas o desenvolvimento de modernas tecnologias para a produção de tecidos, incluindo o uso de muitas substâncias químicas sintéticas para melhorar os produtos, tornou-se um sério problema em relação ao lançamento direto e indireto de resíduos de tais produtos no ecossistema aquático (AL-SABTI, 2000).

O processo de tingimento de fibras e tecidos representa uma área de destaque na indústria têxtil, porém, infelizmente, é também considerado um grande problema ambiental. As indústrias de tingimento consomem cerca de 7×10^5 toneladas/ano de corantes e pigmentos em todo o mundo (NIGAM et al., 1996; RAJAGURU et al., 1999), sendo 26.500 toneladas só no Brasil (GUARATINI; ZANONI, 2000) e cerca de 10 a 15% do total utilizado são perdidos durante o processo e liberados para o meio ambiente (RAJAGURU et al., 1999; NAM; RENGANATHAN, 2000). Devido a exigências do mercado consumidor, em relação à diversidade de cores e tonalidades, resistência da cor à exposição à luz, lavagem, transpiração, etc, estima-se que cerca de 10.000 tipos de corantes são produzidos em escala industrial, sendo 30% destes disponíveis para a indústria têxtil, entre os quais, muitos possuem conhecidos efeitos tóxicos em diferentes sistemas biológicos (GUARATINI; ZANONI, 2000; BECHTOLD et al., 2003; SILVA; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2004).

A tecnologia moderna no tingimento de fibras e tecidos consiste em várias 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 produção (ou montagem) do corante diretamente sobre a fibra, pela combinação de um corante precursor sem grupos sulfônicos e a formação de um composto solúvel, permite um método de tingimento de fibras celulósicas (especificamente alongadas) com alto padrão de fixação e alta resistência à luz e umidade (GUARATINI; ZANONI, 2000).

A fixação do corante à fibra é feita por 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 em água corrente para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Classificação dos corantes

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), existem diversos tipos de corantes que podem ser classificados de acordo com sua estrutura química ou com a forma com que ele é fixado à fibra. A seguir, são detalhadas algumas características dos principais tipos de corantes utilizados industrialmente, de acordo com o modo pelo qual eles são fixados.

- **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. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona, como grupos cromóforos, e os grupos clortriazinila e sulfatoetilsulfonila, como grupos reativos;
- **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. Esta classe de corantes é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo (díazo, triazo, etc.) ou pré-transformados em complexos metálicos;

- **Corantes Ácidos** - O termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes corantes caracterizam-se por substâncias com estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação;
- **Corantes a Cuba** - É uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. Eles são aplicados praticamente insolúveis em água, porém, durante o processo de tintura, eles são reduzidos com ditionito, em solução alcalina, transformando-se em um composto solúvel (forma leuco). Posteriormente, a subsequente oxidação pelo ar, peróxido de hidrogênio, etc., regenera a forma original do corante sobre a fibra;
- **Corantes de Enxofre** - É uma classe de corantes que, após a aplicação, se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos ($-S_n-$), os quais são altamente insolúveis em água. Estes corantes usualmente apresentam resíduos altamente tóxicos;
- **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;
- **Corantes Pré- Metalizados** - São úteis principalmente para tintura de fibras protéicas e poliamida. 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. A desvantagem ecológica deste tipo de corante está associada ao alto conteúdo de metal (cromo) nas águas de rejeito;
- **Corantes Branqueadores** - As fibras têxteis no estado bruto, por serem compostas primariamente de materiais orgânicos, apresentam como característica uma aparência amarelada, por absorver luz, particularmente na faixa de baixo comprimento de onda.

Têm-se também os azo corantes, para os quais será dado uma maior ênfase, por se tratar da classe de corantes estudados neste trabalho.

1.2 Corantes Azóicos

O termo azo-corantes ou corantes azóicos refere-se à classe que possui um ou mais grupamentos azo ($N=N$) e são largamente utilizados por indústrias de tingimento de náilon e poliéster por terem boa fixação nas fibras em relação às demais classes (RAFIL et al., 1997; GUARATINI; ZANONI, 2000). 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 (por exemplo, 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; ZANONI, 2000).

Os azo corantes são considerados a classe química mais importante para a indústria de tingimento, com participação de cerca de 65% das formulações comerciais empregadas para colorir tecidos. Além da aplicação na indústria têxtil, essa classe de corantes é bastante utilizada pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997).

Além da toxicidade inerente aos azo corantes, que será discutida a seguir, deve-se lembrar que, cerca de 15% dos corantes utilizados durante o processo de tingimento, são encontrados nos efluentes brutos das indústrias (ARSLAN et al., 1999). Embora tenha sido anteriormente citado que os azo corantes apresentam boa fixação às fibras, em comparação com outros corantes sintéticos, esta fixação é de no máximo 85%. Além disso, aproximadamente, 80% dos corantes ácidos e reativos são azo compostos, os quais geralmente resistem à degradação aeróbica, devido à natureza do elétron retirado da ligação azo ($\text{N} = \text{N}$) (FRIJTERS et al., 2006). Dessa forma, grande parte destes compostos presentes na água de descarte proveniente das indústrias têxteis são pobremente removidos pelo sistema de tratamento de efluente, e quando passam pelo tratamento biológico eles podem ser transformados em compostos mais prejudiciais.

Toxicidade dos corantes azóicos

Como já enfatizado neste trabalho, uma parte dos corantes empregados nos processos de tingimento são perdidos para o meio ambiente. Desta forma, os humanos podem ser expostos, pelo consumo de água ou de alimentos contaminados enfatizando a importância do estudo dos efeitos toxicológicos destes compostos (UMBUZEIRO et al., 2005). A toxicidade aguda dos corantes não é relevante, cerca de 90% dos corantes avaliados pela ETAD (*Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers*) apresentaram valores de DL_{50} para ratos maiores que 2×10^3 mg/kg, sendo que os maiores valores foram atribuídos aos corantes tipo azóicos (ROBINSON et al., 2001).

O grande interesse da Toxicologia por estes compostos, porém, se deve às exposições crônicas a baixas concentrações. A exposição a alguns azo corantes tem sido relacionada ao desenvolvimento de câncer de bexiga em humanos, sarcomas esplênicos, hepatocarcinomas e anomalias nucleares em animais experimentais e aberrações cromossômicas em células de mamíferos (PERCY; MOORE; CHIPMAN, 1989; MANSOUR et al., 2007). Desde a descoberta da mutagenicidade e da carcinogenicidade da benzidina, 2-naftilamina e dos azo corantes derivados desses compostos, estão surgindo muitos artigos, os quais descrevem o potencial risco para os humanos de numerosos corantes sintéticos (FREEMAN et al., 1987). É importante salientar que a exposição ocupacional aos compostos benzidina, 3,3-dimetilbenzidina e 3,3-dimetoxibenzidina tem sido fortemente relacionada à indução de câncer de bexiga. A demonstração de níveis detectáveis destes três compostos na urina de trabalhadores, potencialmente expostos aos corantes derivados de benzidina, e a presença de aminas aromáticas na urina de animais teste acompanhados pela administração de azo corantes têm levantado preocupações sobre a saúde e segurança de trabalhadores de indústrias envolvidas com a produção ou o uso de azo corantes (GOLKA; KOPPS; MYSLAK, 2004).

Os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e tóxicos de azo corantes poderiam decorrer da ação direta do próprio agente ou de derivados aril amina, gerados durante a biotransformação redutiva da ligação azo (RAJAGURU et al., 1999). Os azo corantes que entram no corpo humano pela ingestão podem ser metabolizados em aminas aromáticas pelas azoredutases dos microorganismos intestinais. Se os azo corantes forem nitro, podem ser metabolizados pelas nitroredutases produzidas pelos mesmos microorganismos (UMBUZEIRO et al., 2005). Enzimas hepáticas de mamíferos e outros organismos podem também acelerar a clivagem redutiva da ligação azo e a nitroredução do grupo nitro, entretanto, tem sido mostrado que a azoredutase microbiana intestinal e a nitroredutase apresentam o mais importante papel neste tipo de metabolismo. Em ambos os casos, se *N*-hidroxilaminas são formadas, tais compostos são capazes de causar dano ao DNA. Se os corantes são completamente reduzidos a aminas aromáticas, podem ser oxidados também a *N*-hidroxiderivados pelas enzimas P450. Além disso, os radicais *N*-hidróxi podem ser acetilados pelas enzimas, tais como *O*-acetiltransferase, gerando íons eletrofílicos

de nitrogênio capazes de reagir com o DNA para formar adutos (ARLT et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005). A geração de espécies reativas de oxigênio também parece estar envolvida na genotoxicidade de aminas *O*-hidróxi-aromáticas (SWEENEY; CHIPMAN; FORSYTHE, 1994).

Estudos demonstram que alguns azo corantes apresentam atividade mutagênica e genotóxica em testes com microorganismos e células de mamíferos (FREEMAN et al., 1990; GARG et al., 2002, UMBUZEIRO et al., 2005). Infelizmente, esses estudos ainda estão restritos a um pequeno número de corantes. Considerando que existem mais de 3.000 tipos de corantes azóicos disponíveis para os vários ramos industriais, e que seus efeitos tóxicos e/ou mutagênicos estão intimamente relacionados com a natureza e a posição dos substituintes ligados ao grupo azo, existe a necessidade de realização da avaliação da toxicidade de cada corante individualmente, tendo em vista que pequenas mudanças na molécula podem alterar drasticamente suas propriedades tóxicas (HASHIMOTO; WATANABE; DEGAWA, 1977; CHUNG; STEVENS, 1993; UMBUZEIRO et al., 2005). Por exemplo, o 3-metóxi-4-aminoazobenzeno é um potente carcinógeno para ratos e extremamente mutagênico para bactérias, enquanto que o 2-metóxi-4-aminoazobenzeno é não carcinogênico e fracamente mutagênico (HASHIMOTO; WATANABE; DEGAWA, 1977). Assim, a atividade biológica dos corantes difere grandemente, apesar de apresentar similaridades em suas estruturas, portanto, as propriedades toxicológicas destes corantes não podem ser generalizadas com referência a somente um grupo (AL-SABIT, 2000).

Neste trabalho foram estudados os corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 (Figura 1) que pertencem à classe dos azo corantes, empregados em indústrias de tingimento de náilon e poliéster instaladas no Brasil. Em pesquisa realizada no TOXNET (*Hazardous Substances Data Bank*), foram encontrados poucos dados relativos à toxicidade destes compostos. Com relação à atividade genotóxica destes corantes, nenhum dado foi encontrado nesta base de dados. Desta forma, este estudo propõe a avaliação do potencial genotóxico destes corantes através do teste de micronúcleo com citocalasina em linfócitos humanos e em células HepG2.

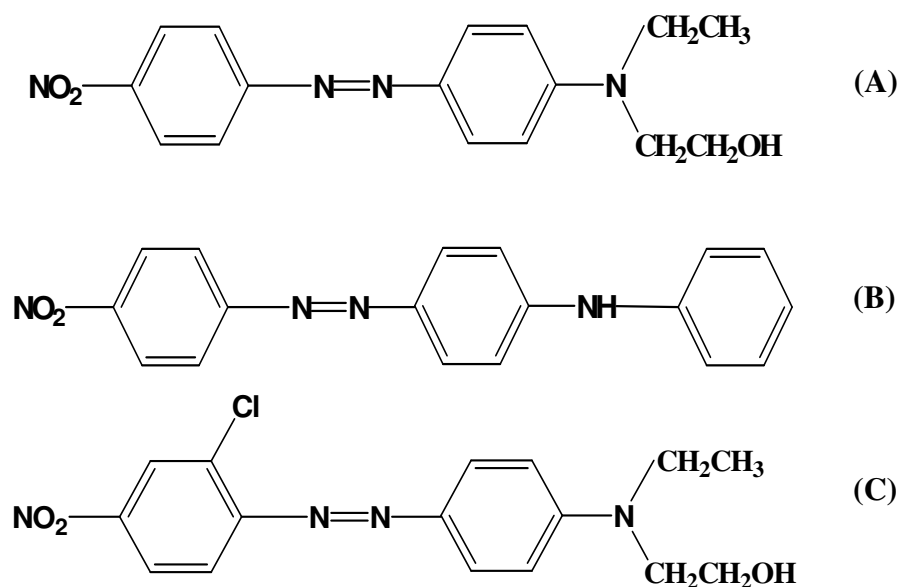


FIGURA 1: Estrutura química dos azo corantes selecionados como modelo: (A) Disperse Red 1, (B) Disperse Orange 1, (C) Disperse Red 13.

1.3 O teste de micronúcleo para avaliar mutações cromossômicas

Mutação é uma alteração permanente do material genético, que pode ocorrer tanto em células somáticas quanto em células germinativas, sendo estas alterações chamadas de mutações somáticas e germinativas, respectivamente. As mutações somáticas não podem ser transmitidas à prole, mas as mutações germinativas podem ser transmitidas a parte da prole ou a toda ela (GRIFFITHS et al., 1998). Estas alterações podem ser classificadas como gênicas ou cromossômicas:

- Na mutação gênica, ocorre alteração de um alelo de um gene, tornando-se um alelo diferente e, como tal alteração ocorre dentro de um único gene e está em um *locus* cromossômico (“ponto”), a mutação gênica também é chamada de mutação de ponto (GRIFFITHS et al., 1998);
- Em outro nível de alteração hereditária, a mutação cromossômica, segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros, ou mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram. Os efeitos de uma mutação cromossômica se devem a novos arranjos de cromossomos e dos genes que eles contêm

(GRIFFITHS et al., 1998; GRIFFITHS; GELBART; MILLER; LEWONTIN, 2001; GRIFFITHS et al., 2006). Muitas destas alterações levam a anomalias de funcionamento da célula e do organismo. Existem dois motivos básicos para isso: primeiro, as mutações cromossômicas podem resultar em número ou posição anormal de genes; segundo, se a mutação cromossômica envolver quebra de cromossomos, o que em geral ocorre, a quebra pode ocorrer no meio de um gene, perturbando assim o seu funcionamento (GRIFFITHS et al., 1998; GRIFFITHS et al., 2001).

Os ensaios com micronúcleos são utilizados para detectar algumas formas de mutações cromossômicas. Micronúcleo (MN) (Figura 2) é definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os MNs são formados durante o processo de divisão celular, quando, na telófase, o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São constituídos por fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que são perdidos durante a divisão nuclear e, por isso, foram excluídos do núcleo principal das células filhas. Desta forma, a detecção de micronúcleos representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico (FENECH, 2000; FENECH; CROTT, 2002; BONASSI et al., 2003; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003), sendo considerados como mutações que são transmitidas às células, pois o dano genético se manifesta nas células filhas. É importante ressaltar que os MNs são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos causados no DNA, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MN após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da frequência de MNs entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH, 1997).

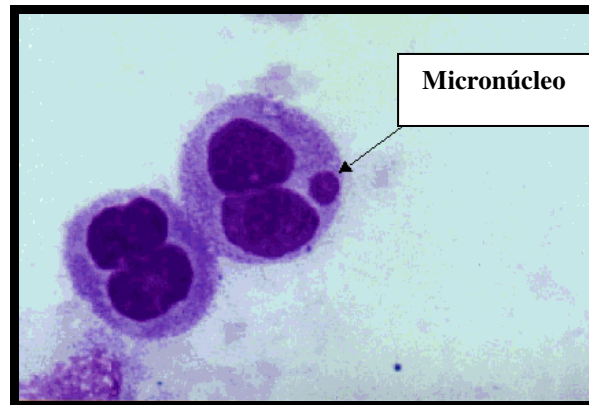


FIGURA 2: Micronúcleo em célula binucleada, proveniente de ação aneugênica. Fonte:<http://we.vub.ac.be/~cege/volders/ENG/tests/MN.htm>.

O MN abriga fragmentos cromossômicos resultantes de:

- a) quebra do DNA;
- b) replicação sobre o molde de DNA danificado;
- c) inibição da síntese de DNA (ALBERTINI et al., 2000).

E os cromossomos inteiros presentes nos MNs são primeiramente oriundos da falha no fuso mitótico, cinetócoro, ou outra parte do aparato mitótico, ou por dano nas sub-estruturas cromossômicas, nas alterações na fisiologia celular ou no mecanismo desregulador. Assim, um aumento da frequência de células micronucleadas é um biomarcador de efeitos genotóxicos, que podem refletir a exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos (ALBERTINI et al., 2000).

Com isso, o teste de micronúcleo em células é de extrema relevância para a Toxicologia Genética e Ambiental, tendo em vista que detecta mutações cromossômicas, podendo ser considerado como marcador precoce para a carcinogênese, considerando que este tipo de dano é encontrado em células de pacientes com câncer (BONASSI et al., 2003; BONASSI et al., 2007).

Para a realização do teste de micronúcleo, podem ser empregados diferentes tipos de células, como as vegetais, humanas e de outros mamíferos, desde que sejam células capazes de se dividir ou que seja possível induzir a divisão; e que este processo seja conhecido e passível de controle (FENECH, 2000).

1.3.1 Teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN)

No teste de micronúcleo *in vitro*, é importante a utilização de citocalasina B, um inibidor da polimerização da proteína actina, requerida para a formação de anel de microfilamentos, que induz à contração do citoplasma e divisão da célula em duas células-filhas (citocinese) (FENECH; CROTT, 2002; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). Essa substância leva à inibição da citocinese, mas não impede o processo de divisão nuclear. Como resultado, observa-se um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão nuclear (FENECH, 2000; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). A análise em células binucleadas permite não somente a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir em sua cinética de divisão, mas também uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas, considerando que seria necessário avaliar o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos observados em células binucleadas (FENECH, 1997; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

O teste de micronúcleo com citocalasina pode ser utilizado para o monitoramento de populações expostas a substâncias mutagênicas e para avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos (BONASSI et al., 2003; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). Além disso, pode ser empregado como ferramenta na elucidação do mecanismo de ação de agentes citogenéticos, como a cilindrospermopsina, considerada um potente inibidor de proteínas de síntese (HUMAGE et al., 2000).

A técnica de bloqueio da citocinese, em que se usa a citocalasina B, capacita tais células a serem reconhecidas por suas aparências binucleadas, como mostra a Figura 3 (FENECH et al., 1999).

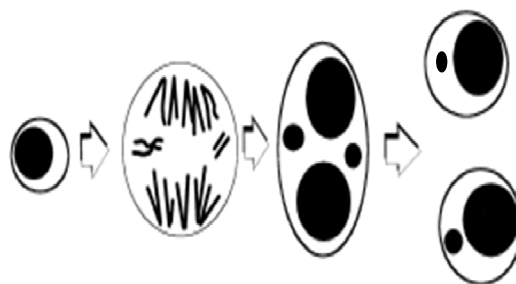


FIGURA 3: A expressão do micronúcleo em uma célula em divisão. Micronúcleos originados do revestimento de cromossomos inteiros e de fragmentos de cromossomos acêntricos em uma célula na fase anáfase de divisão. Fonte: Modificado de Fenech et al., 1999. A reprodução desta figura foi autorizada pelo autor.

Já foi mencionado que os micronúcleos são originados por perdas de cromossomos inteiros ou por fragmentos cromossômicos acêntricos. Porém, estes eventos somente podem ser observados em células com divisão nuclear completa, as quais são reconhecidas pela sua aparência binucleada, após o bloqueio da citocinese pela citocalasina-B (FENECH, 2007). Desta forma, de acordo com a literatura, a maioria dos ensaios de micronúcleos utilizados usa o bloqueio da citocinese.

1.3.1.1 Micronúcleos em linfócitos humanos

Os linfócitos humanos têm sido utilizados como sistemas testes na avaliação de danos genéticos, devido às suas vantagens em relação a outras células como: por se tratarem de células humanas, o peso da evidência é maior, além disso, são células de fácil obtenção e que não necessitam da manutenção das culturas. A adaptação do teste de MN foi estabelecida a partir da técnica aplicada em células de medula óssea de roedores, *in vivo*, com algumas modificações. No entanto, foi com base na descoberta de Carter (1967), que havia demonstrado que células de camundongo *in vitro* tinham sua citocinese inibida pela citocalasina B, sem que houvesse bloqueio da mitose, que Fenech & Morley (1985) começaram a utilizar esse composto para marcar as células que passaram por um ciclo de divisão, reduzindo, assim, a limitação do teste do micronúcleo *in vitro* (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

1.3.1.2 Teste de micronúcleos em células HepG2

As células HepG2 foram isoladas em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino de 11 anos. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998). Essas células conservam as atividades das enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, como também as enzimas de fase II, incluindo glutationa-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuronosiltransferases, sendo que tais enzimas estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, as quais apresentam importante função na ativação e detoxificação de carcinógenos reativos de DNA (UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 1999; MAJER et al., 2004). Portanto, é aceitável que os ensaios com células HepG2 refletem mais adequadamente os danos causados por mutágenos que os testes *in vitro* feitos com bactérias ou células de mamíferos, os quais requerem a adição de misturas de ativação exógenas para mimetizar o metabolismo de compostos de ação indireta (UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 2000; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

A linhagem de células HepG2 têm sido utilizada em um largo número de estudos de genotoxicidade, e protocolos foram desenvolvidos, com sucesso, para testes com os seguintes *endpoints*: aberrações cromossômicas, troca de cromátides-irmãs, micronúcleos e mutações gênicas, os quais podem ser mensurados diretamente por tais células (NATARAJAN; DARROUDI, 1991; KNASMULLER et al., 1998; UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 1999). Estes modelos são vantajosos, pois são capazes de detectar os efeitos genotóxicos no interior das células, nas quais os metabólitos reativos de DNA são formados (UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 1999).

1.3.1.3 Critérios estabelecidos para realizar o teste de micronúcleo (FENECH, 1993; FENECH et al., 2003).

As células com citocinese bloqueada que podem ser marcadas pela frequência de micronúcleos devem apresentar as seguintes características:

- Devem ser binucleadas;
- Os dois núcleos em uma célula binucleada (BN) devem ter membranas nucleares intactas e devem ser situados dentro do mesmo limite citoplasmático;
- Os dois núcleos em uma célula BN devem ser aproximadamente iguais no tamanho e na intensidade da coloração;
- Os dois núcleos dentro da célula podem estar unidos por uma fina ponte nucleoplasmática, cuja largura não pode ser superior a um quarto do diâmetro do maior núcleo;
- Os dois núcleos principais em uma célula BN podem tocar-se, mas o ideal seria não sobrepor-se. Uma célula com dois núcleos sobrepostos pode ser marcada somente se os limites de cada núcleo forem distinguíveis;
- O limite citoplasmático ou membrana de uma célula BN deve ser intacta e claramente distinguível do limite citoplasmático de células adjacentes.

1.3.1.4 Critérios para o reconhecimento de micronúcleos (MNs) (FENECH et al., 2003; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

MNs são morfologicamente idênticos, mas menores que o núcleo principal. Eles apresentam as seguintes características:

- Um diâmetro entre 1/16 até, no máximo, 1/3, dos núcleos principais (ou entre 1/256 a 1/9 da área de um dos núcleos principais);
- Ter formato redondo ou oval;
- Não apresentar refringências;
- Não estar ligados ou conectados ao núcleo principal;
- Podem tocar, mas não podem sobrepor o núcleo principal e o limite micronuclear deve ser distinguível do limite nuclear;
- Ter a mesma intensidade de cor do núcleo principal.

1.3.1.5 Aplicações do teste de micronúcleo

Teste de micronúcleo em medula óssea de ratos evidenciou a potente ação clastogênica do azo corante Direct Red 2, alertando que a exposição a esse corante ou aos seus metabólitos podem representar risco à saúde humana. Os autores escolheram este teste pela rapidez, pelo baixo custo e pelo fato de responder tanto a agentes clastogênicos, como a agentes aneugênicos (RAJAGURU et al., 1999). E o uso do teste de micronúcleo em peixe, que tem tido um importante papel na avaliação de água contaminada por poluentes, além de proporcionar uma advertência precoce quanto à ameaça genotóxica para peixes, ecossistemas e finalmente para os humanos (AL-SABIT, 2000).

O ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CB-MN) pode ser utilizado para medir eficientemente efeitos genotóxicos e citotóxicos de espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio, superóxido, neutrófilos ativados e/ou radiação ionizante (FENECH; MORLEY, 1986; GREENROD; FENECH, 2003). Devido a essa capacidade, este teste foi escolhido para avaliar o efeito protetor do vinho contra danos ao DNA, causados pelas espécies reativas de oxigênio (GREENROD; FENECH, 2003). Uma correlação comum entre doença cardiovascular e o câncer é feita pela observação de frequência elevada de micronúcleos, que é um marcador de dano ao DNA, e está associada com o aumento da severidade da doença da artéria coronária (BOTTO et al., 2001).

O teste de micronúcleo também foi aplicado em células respiratórias esfoliadas da mucosa nasal de trabalhadores expostos ao formaldeído, a fim de se avaliar o risco genotóxico associado a esta exposição (BALLARIN et al., 1992). Sabe-se que o formaldeído é um composto mutagênico em vários sistemas biológicos, incluindo bactéria, insetos, plantas e fungos (AUERBACH; MOUTSCHEN-DAHMEN; MOUTSCHEN, 1977; BALLARIN et al., 1992).

Dentre outras aplicações, este teste também foi utilizado para avaliar a genotoxicidade de arsênio (As) empregando raízes de *Allium cepa* (YI; WU; JIANG, 2007). Este metal é um elemento de ocorrência natural, amplamente distribuído na crosta terrestre, e é um dos mais tóxicos poluentes do meio ambiente (DUTRÉ et al., 1998). Em muitas partes do mundo, tem-se observado intoxicação por As, geralmente associada à exposição crônica ao meio ambiente, tanto pela ingestão de

água contaminada como pelos poluentes industriais. Evidência epidemiológica tem demonstrado que a exposição prolongada ao As está fortemente associada ao aumento do risco a várias doenças e ao câncer (YI; WU; JIANG, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que este metal induz aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos em animais e humanos (GURR et al., 1993; YI; WU; JIANG, 2007).

1.3.1.6 Relação entre micronúcleos (MN) e o desenvolvimento de câncer

O câncer é uma doença genética que tem diversas causas, que estão principalmente relacionadas a uma classe especial de genes chamados de genes do câncer ou proto-oncogenes. Os oncogenes normalmente desempenham funções celulares básicas, em geral relacionadas à regulação da multiplicação celular. Entretanto, vários tipos de eventos podem transformar um proto-oncogene em oncogene, estado no qual ele promove as duas principais características do câncer: multiplicação celular descontrolada, levando a um crescimento excessivo de um grupo de células chamado de tumor; e a dispersão de células tumorais pelo corpo, um processo chamado de metástase. Um dos principais modos pelos quais os proto-oncogenes podem ser transformados em seu estado causador de câncer (oncogênico) é pela mutação que ocorre em um proto-oncogene de uma única célula, que então sofre várias multiplicações celulares para formar um tumor. Como todas as células do tumor possuem o oncogene, pode-se concluir que um tumor é um clone mutante. Por isto, o câncer é tido como uma doença predominantemente genética (GRIFFITHS et al., 1998).

Assim, a formação de MNs na divisão celular, resultante da quebra de cromossomos devido ao não-reparo ou ao reparo incorreto de lesões do DNA ou à incorreta segregação por causa de mal funcionamento do ciclo mitótico, são eventos que podem ser induzidos por um estresse oxidativo, exposição aos clastógenos, defeitos genéticos no ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA, como também deficiências em nutrientes exigidos como cofatores no metabolismo do DNA e no maquinário de segregação cromossômica (FENECH, 2005; BONASSI et al., 2007). Todos esses eventos podem causar a formação de MN por rearranjos cromossômicos, expressões gênicas alteradas ou aneuploidia, os quais são efeitos

associados com fenótipo de instabilidade cromossômica frequentemente presente no câncer (FENECH, 2002).

A relação entre indução de MN e o desenvolvimento de câncer é apoiada por inúmeras observações, tais como: i) uma maior freqüência deste biomarcador em pacientes com câncer não tratados e em indivíduos afetados por doenças congênitas propensas ao câncer, como, por exemplo, a ataxia telangiectasia (FENECH et al., 1999; FENECH, 2002); ii) a presença de freqüências elevadas de MNs na mucosa oral, utilizada como biomarcador de câncer em exames clínicos quimiopreventivos (VAN SCHOOTEN, 2002); iii) a correlação existente entre agentes genotóxicos indutores de MN e carcinogênese, por exemplo, radiação ionizante e ultravioleta (CHANG, 1997) e iv) a correlação inversa entre a freqüência de MN e a concentração sanguínea e/ou dieta ingerida de certos micronutrientes, associados com risco reduzido de câncer, tais como folato, cálcio, vitamina E e ácido nicotínico (FENECH et al., 2005).

Portanto, a quantificação da freqüência de MNs é extensivamente utilizada na epidemiologia molecular e citogenética para avaliar a presença e a extensão de danos cromossômicos em populações humanas expostas a agentes genotóxicos ou que apresentam um perfil genético susceptível (FENECH et al., 1999). Este ensaio também é aplicado com sucesso para identificar dieta e fatores genéticos que têm um significativo impacto sobre a estabilidade genômica (KIMURA et al., 2004). A alta confiabilidade e o baixo custo da técnica do MN têm contribuído para o sucesso mundial e a adoção deste biomarcador para estudos *in vitro* e *in vivo* do dano genômico (BONASSI et al., 2006). Recentemente um artigo foi publicado mostrando que a freqüência de micronúcleo não é somente um indicativo de dano genético, mas também um marcador precoce de carcinogênese (BONASSI et al., 2007).

Dentro deste contexto, é clara a importância do estudo do potencial mutagênico dos diversos compostos aos quais os organismos podem se expor. Obviamente, um evento mutagênico não necessariamente leva ao desenvolvimento do câncer, porém, a detecção da atividade mutagênica é um importante indício para a avaliação do risco à doença.

2. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi investigado o potencial genotóxico e citotóxico de diferentes concentrações dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 em linfócitos do sangue periférico humano e em cultura de células HepG2.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os corantes estudados são potencialmente mutagênicos para os sistemas celulares avaliados. Este efeito é dose-dependente, até um limite a partir do qual se observa queda no número de MNs, provavelmente por toxicidade às células. Este limite observado para os testes com linfócitos foi de 1,0 µg/mL para todos os corantes estudados e para as células HepG2, de 2,0 µg/mL, exceto para o corante Disperse Red 13, para o qual o limite foi a concentração de 1 µg/mL;
- Inicialmente, pode-se dizer que o corante Disperse Red 13 é ligeiramente o mais mutagênico para os linfócitos, seguido do corante Disperse Red 1 e, por último, o corante Disperse Orange 1. Para as células HepG2, os corantes apresentaram potenciais mutagênicos semelhantes;
- Nas concentrações testadas, os corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 não reduziram, de forma significativa, o índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) e a porcentagem de células binucleadas, em comparação ao controle negativo. Logo, pode-se concluir que esses corantes foram claramente genotóxicos, porém não interferiram, com a progressão celular nas condições experimentais deste estudo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

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

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

ARSLAN, I.; BALCIOGLU, I.A.; TUHKANEM, T. Oxidative treatment of simulated dyehouse effluent by UV and near-UV light assisted Fenton's reagent. **Chemosphere**, v. 39, p. 2767-2783, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUM), Brasília.
Definição. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>> Acesso em: 16 de Agosto de 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUM), Brasília.
História. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp> Acesso em: 16 de Agosto de 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). A industrialização no Brasil e o desenvolvimento da moda: um ensaio. Disponível em: <<http://www.abit.org.br/content/area/Pasta.asp?nCodAreaConteudo=23&nCodPastaPai=705>> Acesso em 16 de Agosto de 2006.

AUERBACH, C.; MOUTSCHEN-DAHMEN, M.; MOUTSCHEN, J. Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds. **Mutation Research**, v. 39, p. 317-362, 1977.

BALLARIN C.; SARTO, F.; GIACOMELLI, L.; BARTOLUCCI, G. B.; CLONFERO, E. Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. **Mutation Research**, v. 280, p. 1-7, 1992.

* Este trabalho foi escrito de acordo com as normas da ABNT propostas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

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

BOLOGNESI, C.; ABBONDANDOLO, A.; BARALE, R.; CASALONE, R.; DALPRA, L.; DEFERRARI, M.; DEGRASSI, F.; FORNI, A.; LAMBERTI, C.; LANDO, C.; MIGLIORE, L.; PADOVANI, P.; PASQUINI, R.; PUNTONI, R.; SBRANA, I.; STELLA, M.; BONASSI, S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in human lymphocytes. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 6, p. 249-256, 1997.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v. 543, p. 155-166, 2003.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCICI, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis Advance Access**, v. 28, p.625-631, 2007.

BONATTI, S.; LOHMAN, P.H.M.; BERENDS, F. Induction of micronuclei in Chinese-hamster ovary cells treated with Pt co-ordination compounds. **Mutation Research**, v. 116, p. 149-154, 1983.

BOTTO, N.; RIZZA, A.; COLOMBO, M.G.; MAZZONE, A.M.; MANFREDI, S.; MASETTI, S.; CLERICO, A.; BIAGINI, A.; ANDREASSI, M.G. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. **Mutation Research**, v. 493, p.23-30, 2001.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722–725, 2008.

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

CHANG, W.P., HWANG, B.F.; WANG, D.; WANG, J.D. Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate γ -radiation in residents of irradiated buildings. **The Lancet**, v. 350, p. 330-333, 1997.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E. The reduction of azo dyes by intestinal microflora. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

DUTRÉ, V.; KESTENS, C.; SCHAEP, J.; VANDECASTEELE, C. Study of the remediation of a site contaminated with arsenic. **The Science of the Total Environment**, v. 220, p. 185-194, 1998.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose X-irradiation. **Mutation Research**, v.161, 193-198, 1986.

FENECH, M.; NEVILLE, S.; RINALDI, J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. **Mutation Research**, v. 313, p. 203-207, 1993.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutation Research**, v. 404, p.155-165, 1998.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; WUSHOU, P.C.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human MicroNucleus Project – An internacional collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, 271-283, 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer. . **Drug Discovery Today**, v.22, p. 1128-1137, 2002.

FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, 131-136, 2002.

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v.111, p. 3-32, 2005.

FENECH, M.; BAGHURST, P.; LUDERE, W.; TURNER, J.; RECORD, S.; CEPPI, M.; BONASSI, S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, β -carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability - results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 991-999, 2005.

FENECH, M. PROTOCOL: Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS (FINEP), Rio de Janeiro. Relatório Setorial Preliminar. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/PortalDPP/relatorio_setorial/impressao_relatorio.asp?lst_setor=23> Acesso em 19 de Agosto de 2006.

FERRAZ, E.A. **Comparação da mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade com *Salmonella***: USP, 2008. 155 páginas. Dissertação (mestrado). Programa de Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

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

FREEMAN, H.S.; ESANCY, J.F.; ESANCY, M.K.; MILLS, K.P.; WHALEY, W.M.; DABNEY, B.J. An Approach to the Design of Non-Mutagenic Azo Dyes: 1. The Identification of Non-Mutagenic Precursors and Potential Metabolites. **Dyes and Pigments**, v. 8, p.417-430, 1987.

FRIJTERS, C.T.M.J.; VOS, R.H.; SCHEFFER, C.; MULDER, R. Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system. **Water Research**, v.40, p.1249-1257, 2006.

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

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

GREENROD, W.; FENECH, M. The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage *in vitro*. **Mutation Research**, v. 18, p. 119-126, 2003.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.; MILLER J.H; LEWONTIN, R.C.; M. Mutações Cromossômicas in: _ **Genética Moderna**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap. 8, p.209-240.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER J.H; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Mutação Cromossômica I: Alterações na Estrutura Cromossômica in: _ **Introdução à Genética**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998 , cap. 8, p.197-232, ed. sexta.

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, 1998, cap 7, p.169-196, ed. sexta.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C; GELBART, W.M; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H.. Mutação, Reparo e Recombinação in: _ **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap 14, p.431-460, ed. oitava.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C; GELBART, W.M; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H.. Mudanças cromossômicas em larga escala in: _ **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap 15, p.461-499, ed. oitava.

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

GURR, J.R.; LIN, Y.C; HO, I.C; JAN, K.Y; LEE, T.C. Induction of chromatid breaks and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase. **Mutation Research**, v. 319, p. 135-142, 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.

HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research**, v.472, p.155-161, 2000.

IAMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R.A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**, v.658, p.215–233, 2008.

KIMURA, M.; UMEGAKI, K.; HIGUCHI, M.; THOMAS, P.; FENECH, M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.48-56, 2004.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDEMAN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v.402, p. 185-202, 1998.

KOSMIDER, B.; WYSZYNSKA, K.; JANIK-SPIECHOWICZ, E.; OSIECKA, R.; ZYNER, E.; OCHOCKI, J. CIESIELSKA, E; WASOWICZ, W. Evaluation of the genotoxicity of cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, v.558, p. 93-110, 2004.

MAJER, B.J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; WIT, K.; KANSMÜLLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research**, v. 551, p.153-166, 2004.

MANSOUR, H.B.; CORROLER, D.; BARILLIER, D.; GHEDIRA, K.; CHEKIR, L.; MOSRATI, R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p.1670-1677, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIGA, L. M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D. R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 239, p. 84–97, 2006.

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

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 5, p. 399-403, 1991.

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

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

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

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON 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**, v.444, p.175-180, 1999.

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

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. Em: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas:Ulbra, 2003, p.201-223.

SILVA, M.R.A.; OLIVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.F.P. Estudo da aplicação do processo foto-Fenton solar na degradação de efluentes de indústria de tintas. **Eclética Química**, v. 29, p. 19-26, 2004.

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

SWEENEY, E. A.; CHIPMAN, J. K.; FORSYTHE, S. J. Evidence for Direct-acting Oxidative Genotoxicity by Reduction Products of Azo Dyes. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 119-122, 1994.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213-225, 2000.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 441, p. 215-224, 1999.

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 Chemical Toxicology**, v.43, p. 49-56, 2005.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J.C.; BONA, A.M.L.; CHAGNONA, M.C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p.79-90, 2003.

VAN SCHOOTEN, F.J.; BESARATI NIA, A.; DE FLORA, S.; D' AGOSTINI, F.; IZZOTTI, A.; CAMOIRANO, A.; BALM, A.J.; DALLING, J.W.; BAST, A.; HAENEN, G.R.; VAN'T VEER, L.; BAAS, P.; SAKAI, H.; VAN ZANDWIJIK, N. Effects of oral administration of N-Acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker Study in smokers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.11, p.167-175, 2002.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, v. 383, p. 232-236, 2007.