

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial mutagênico de corantes têxteis por meio do
ensaio de micronúcleo**

Cibele Aparecida Cesila

Ribeirão Preto, 2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial mutagênico de corantes têxteis por meio do
ensaio de micronúcleo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado(a): Cibele Aparecida Cesila

**Orientador(a): Profa. Dra. Danielle Palma
de Oliveira**

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 27/10/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cesila, Cibele Aparecida

Avaliação do potencial mutagênico de corantes têxteis por meio do ensaio de micronúcleo, Ribeirão Preto, 2015.

89 p.:il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Oliveira, Danielle Palma

1. Ensaio de micronúcleo. 2. Ensaio ecotoxicológicos.
3. Acid Black 210. 4. Disperse Red 73. 5. Avaliação de risco.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Cibele Aparecida Cesila

Título do trabalho: Avaliação do potencial mutagênico de corantes têxteis por meio do ensaio de micronúcleo.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais Glória e Antonio, obrigada pelo amor incondicional, pela paciência, pelos ensinamentos, pelos exemplos de honestidade e de ética tão importantes na construção do meu caráter. Obrigada por todos os gestos e palavras de carinho. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Glória e Antonio, meus exemplos de vida, pelo esforço desmedido para me dar uma boa educação e uma vida melhor, obrigada por tudo!

Ao meu avô Benedito (in memoriam), pelo incentivo, pela força, pelo carinho e pela alegria contagiante. Você será eterno em meu coração. À minha avó Alzira, pelos adoráveis fins de semanas, pelas divertidas poesias e por todo carinho e amor.

À minha irmã Lidiane, pelos importantes conselhos, pelo incentivo, pela amizade e por acreditar nos meus sonhos. Você foi a responsável por grande parte do meu crescimento pessoal e também profissional. Obrigada por me ajudar a ser essa pessoa que sou hoje. Aos meus irmãos Robson e Glaucia, obrigada pelo carinho e pela grande amizade. Vocês são pessoas muito importantes na minha vida. Amo vocês.

Ao meu tio Antonio (Toninho), pelo carinho e pelos adoráveis momentos de alegria, tornando a vida mais leve. À minha tia Izildinha, pelo carinho e dedicação desde a minha infância.

À Eleuza Bortoli, Dirceu Bortoli e Marina Bortoli, por toda ajuda, pela preocupação, pelo apoio e pelo incentivo. Obrigada por tudo!

Ao Thiago Bortoli, o grande amor da minha vida. Obrigada pelo companheirismo, pelo amor, por acreditar nos meus sonhos e por estar ao meu lado nos momentos difíceis. Amo você!

À minha orientadora, Dra. Danielle Palma, pela oportunidade de aprendizado, pela importante contribuição na minha carreira acadêmica, pela amizade e pela confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta, pelos ensinamentos e sugestões.

Ao laboratório de Bioquímica, principalmente à Ana Cristina Polizello, obrigada pela disposição em ajudar e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos da CETESB de Ribeirão de Preto: Eduardo, Joaquim, Fátima, Maristela e André, pela receptividade, pelo grande apoio no desenvolvimento do trabalho, ensinamentos e pela amizade.

Aos amigos de laboratório, Camila Mini, Flavia Abe, Gabriela Meireles, Gisele Rodrigues Otávio Pelegrino, Sonia Dreossi, Thalita Zanoni e Klaus Accoroni pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração, pelo apoio e pela disposição em ajudar. Foi um prazer trabalhar com vocês!

Aos meus amigos, Marília Ishizawa, Vitor Lacerda e Cristina Maeda, pelos momentos de descontração, pelas conversas e pelo apoio. Vocês são especiais!

Às secretárias da pós graduação, Rosemary e Rosana, pela dedicação, excelente trabalho desenvolvido e receptividade.

Às agências de fomento FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Universidade de São Paulo pelo suporte no trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

"De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!"
Fernando Pessoa

"A dúvida é o princípio da sabedoria"
Aristóteles

RESUMO

CESILA, C. A. **Avaliação do potencial mutagênico de corantes têxteis por meio do ensaio de micronúcleo**. 2015, 89f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Os corantes possuem grande importância nos diversos segmentos industriais, sendo utilizados em medicamentos, cosméticos, alimentos, roupas, plásticos, borracha, dentre outros. Atualmente, são produzidos no mundo mais de 7×10^5 toneladas de corantes por ano, sendo que aproximadamente 26.500 toneladas/ano são consumidas no Brasil. A produção desses compostos, apesar de ter grande importância econômica é alvo da preocupação ambiental, pois cerca de 2 a 50% dos corantes utilizados na indústria alcançam o ambiente aquático durante o processo de produção e de processamento têxtil. Desta forma aproximadamente 280.000 toneladas de corantes da indústria têxtil são descarregados nos efluentes industriais a cada ano no mundo. Dentro desse contexto, os estudos envolvendo a avaliação de risco de corantes e seus produtos de degradação são de grande importância para a análise do impacto que esses compostos podem causar à saúde humana e ao ecossistema. O Acid Black 210 é um azo corante frequentemente utilizado no tingimento do couro, algodão e tecido de lã, representando aproximadamente 80 a 90% do corante de cor preta utilizado na indústria. O Disperse Red 73 é um azo corante de cor vermelha, frequentemente utilizado no tingimento de tecidos. No entanto, não existem estudos publicados na literatura científica sobre o potencial genotóxico e toxicológico desses corantes e sobre o monitoramento da presença desses corantes em águas superficiais. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório, mostraram que o corante Disperse Red 73 induziu mutagenicidade nas linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* e que foi extremamente tóxico para a espécie de *Daphnia similis* em ensaios de toxicidade aguda. Desse modo, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial mutagênico dos corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73 através do ensaio de micronúcleo em células HepG2 e avaliar os efeitos ecotoxicológicos agudos do corante Acid Black 210 utilizando os organismos da espécie *Daphnia similis*. Adicionalmente foram realizados os ensaios de avaliação de proliferação celular, ensaio de avaliação da morte celular por necrose e apoptose e ensaio de parada do ciclo celular utilizando o corante Acid Black 210 em células HepG2. Os resultados obtidos mostraram que o corante Disperse Red 73 não induziu danos cromossômicos em células HepG2 nas condições testadas. O Acid Black 210 não provocou a morte celular por apoptose e/ou necrose, em altas concentrações provocou parada no ciclo celular e induziu a citotoxicidade nos ensaios de proliferação celular. Os ensaios de micronúcleo realizados com o corante Acid Black 210 foram inconclusivos. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que não há indícios de que o corante Disperse Red 73 induza mutações cromossômicas e sugerem que o corante Acid Black 210 possua baixa toxicidade. No entanto, outros ensaios serão necessários, para que seja realizada uma avaliação de risco ambiental e para os seres humanos. Os resultados obtidos nesse trabalho juntamente com outros resultados do nosso grupo de pesquisa fornecerão subsídios para a realização da avaliação do perigo e caracterização do risco de exposição dos seres vivos a esses corantes.

Palavras - chave: ensaio de micronúcleo, ensaios ecotoxicológicos, Acid Black 210, Disperse Red 73, avaliação de risco.

ABSTRACT

CESILA, C. A. **Evaluation of the mutagenic potential of textile dyes using the micronucleus assay.** 2015, 89f. Dissertation (Master), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Dyes and pigments are important compounds in different areas, for example in the medicine, cosmetic, food, clothing, plastic, rubber, and other industries. Currently, the production of these compounds is around 7×10^6 tons per year all over the world, with 26,500 tons per year being consumed in Brazil. The production of dyes, despite its economic relevance, is a subject of environmental concern, because 2 to 50 % of dyes are discharged directly into wastewater during their production process, corresponding to approximately 280,000 t of textile dyes being discharged in the environment worldwide through industrial effluents every year. In this context, the studies of the risk assessment of the dyes and their degradation products are very relevant to assess the impact of these compounds to the human health and the ecosystem. The Acid Black 210 is an azo dye commonly used in the dyeing of leather, cotton, and wool, representing approximately 80 to 90 % of the black dye used in the industry. However, there are not published studies in the scientific literature about the genotoxic potential and the toxicological concerns of this dye, including its monitoring presence in surface waters. Preliminary studies in our laboratory had shown that the Disperse Red 73 dye induces mutagenicity in the TA98 and TA100 *Salmonella typhimurium* strains and it is extremely toxic to *Daphnia similis* in acute toxicity tests. Thus, this study aimed to evaluate the mutagenic potential of the dyes Acid Black 210 and Disperse Red 73 through the micronucleus assay in HepG2 cell, and the acute ecotoxicological effects of the dye Acid Black 210 using the *Daphnia similis* test. Additionally, it was performed cell proliferation tests, the evaluation of the cell death by apoptosis and necrosis, and the cell cycle arrest assay using the Acid Black 210 dye in HepG2 cells. The results obtained in this study showed that the Disperse Red 73 dye did not induce chromosomal damage in HepG2 cells under the conditions tested. Acid Black 210 dye did not cause cell death by apoptosis and/or necrosis, at higher concentrations cause arrest cell cycle and induced cytotoxicity in cell proliferation assays. Micronucleus assays performed with the dye Acid Black 210 showed inconclusive. Therefore, the results of this study show that there is no evidence that the Disperse Red 73 dye induces chromosomal mutations and suggest that the Acid Black 210 dye has low toxicity. However, other tests will be required to do environmental and human risk assessments of these dyes. The results of this study along with other results of our research group will provide these additional requirements.

Keywords: Micronucleus assay, ecotoxicological assays, Acid Black 210, Disperse Red 73, risk assessment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do corante Acid Black 210.....	6
Figura 2 - Estrutura química do corante Disperse Red 73	7
Figura 3 - Representação esquemática das fases S (síntese), M (mitose), G1 e G2 e dos <i>checkpoints</i> que ocorrem durante o ciclo celular.....	10
Figura 4 - Formação do micronúcleo através da perda de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros na anáfase e formação de célula binucleada devido ao bloqueio da citocinese.	15
Figura 5 - Fluxograma dos ensaios realizados para avaliação do potencial mutagênico dos corantes Disperse Red 73 e Acid Black 210 e para avaliação da toxicidade do corante Acid Black 210. Ensaios indicados na área de cor verde foram realizados para o Disperse Red 73 e Acid Black 210. Ensaios localizados na área de cor roxa foram realizados somente para o corante Acid Black 210	21
Figura 6 - Células HepG2 binucleadas obtidas no ensaio de micronúcleo, coradas com o corante alaranjado de acridina na concentração de 10 µg/mL, durante o tempo de exposição de 1 minuto. Aumento de 400X. (A) Célula binucleada sem micronúcleo, obtidas no controle negativo (500 µL de PBS). (B) Célula binucleada, contendo um micronúcleo (indicado pela seta branca), obtida com a exposição das células a 0,015 µg/mL de doxorubicina	34
Figura 7 - Espectro de absorção visível do corante Disperse Red 73, na faixa de comprimento de onda (λ) de 400-700 nm	35
Figura 8 - Método de exclusão pelo azul de tripan para verificar a viabilidade celular das culturas HepG2 tratadas com o corante Disperse Red 73. Os resultados representam a média de três repetições.....	37
Figura 9 - Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Como controle positivo (CP) foi utilizado a doxorubicina na concentração 0,015 µg/mL. Em cada repetição foram analisadas 2000 células binucleadas e os resultados expressam a média e o desvio padrão de três repetições independentes (n=3)	38
Figura 10 - Índice de proliferação celular do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Como controle positivo (CP) foi utilizado a doxorubicina na concentração 0,015 µg/mL	39
Figura 11 - Espectro de absorção visível do corante Acid Black 210 comercial, na faixa de comprimento de onda (λ) de 400-700 nm.....	40

- Figura 12** - Avaliação da citotoxicidade do corante Acid Black 210 comercial em células HepG2, através do ensaio de MTT. Tempo de exposição de 24 horas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três repetições. CN: Controle negativo (Culturas de células tratadas com meio DMEN contendo 10% de soro bovino fetal). CP: Controle positivo (Cultura de células tratadas com CCCP na concentração 0,0001 mol/L)..... 41
- Figura 13** - Avaliação da proliferação através do ensaio colorimétrico sulforodamina B em células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Acid Black 210. Tempo de exposição de 24 horas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três repetições. CN: Controle negativo (Culturas de células tratadas com meio DMEN contendo 10% de soro bovino fetal). CP: Controle positivo (Cultura de células tratadas t-butyl hidroperóxido 100 μ M) 44
- Figura 14** - Caracterização do tipo de morte celular induzida pelo tratamento das células HepG2 utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210. Os resultados estão expressos a partir da média e desvio padrão de três experimentos independentes 45
- Figura 15** - Progressão do ciclo celular em células HepG2 expostas a diferentes concentrações do corante Acid Black 210 em um tempo de exposição de 24 horas. As células foram marcadas com IP (Iodeto de Propídeo) e o conteúdo do DNA foi analisado por citometria de fluxo. 46
- Figura 16** - Imobilidade das *Daphnias similis* expostas a diferentes concentrações do corante Acid Black 210, por um período de 48 horas sem iluminação e alimento 49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleo em três repetições, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (% BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Como controle positivo foi utilizado doxorrubicina na concentração de 0,015 µg/mL..... 37
- Tabela 2** - Média e desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições no teste de micronúcleo realizados em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Acid Black 210. % BN: Porcentagem de células binucleadas. MN: Número total de micronúcleo, IPCB: Índice de proliferação do bloqueio da citocinese 43
- Tabela 3** - Caracterização do tipo de morte celular induzida pelo tratamento das células HepG2 utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210. Os resultados expressam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado a cisplatina na concentração de 48 µg/mL 45
- Tabela 4**. Efeito de diferentes concentrações do corante Acid Black 210 na progressão do ciclo celular em células HepG2, incubadas com o corante por 24 horas. As células foram marcadas com IP (Iodeto de Propídeo) e o conteúdo do DNA foram analisados por citometria de fluxo. Como controle positivo foi utilizado a cisplatina na concentração de 12µg/mL 47
- Tabela 5** - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Acid Black 210 por 24 horas sem iluminação e alimento 48
- Tabela 6** - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Acid Black 210 por 48 horas sem iluminação e alimento 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BN	Célula binucleada
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CAS	Chemical Abstract Service
CE ₅₀	Concentração efetiva 50 %
CEO	Concentração de efeito observado
CENO	Concentração de efeito não observado
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CCCP	Carbonil-cianeto-p-trifluorometoxifenil-hidrazona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL ₅₀	Dose Letal 50 %
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ETAD	Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing Industry
HepG2	Linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPBC	Índice de proliferação do bloqueio da citocinese
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleo
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
PBS	Tampão salina fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
PIB	Produto interno Bruto
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm:	Rotações por minuto
-N=N-	Grupamento azo
λ	Comprimento de onda
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Os azo corantes	4
1.2 Corantes estudados	6
1.3 Avaliação de Risco	7
1.4 Ensaio ecogenotoxicológicos.....	9
1.4.1 Ciclo celular.....	9
1.4.2 Ensaio de micronúcleo para avaliação de mutações cromossômicas.....	13
1.4.3 Processo de morte celular	15
1.4.4 Células HepG2.....	17
1.4.5 Ensaio de ecotoxicidade aguda	17
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODO	21
3.1 Corantes estudados	22
3.2 Cultura de célula HepG2	22
3.2.1 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT em células HepG2.....	22
3.3 Ensaio de micronúcleo em culturas de células HepG2.....	23
3.3.1 Padronização do método de coloração das lâminas de micronúcleo utilizando o corante alaranjado de acridina	23
3.3.2. Protocolo do ensaio de micronúcleo em células HepG2	24
3.3.3 Critérios estabelecidos para realizar o teste de micronúcleos	26
3.3.4 Critérios para o reconhecimento de micronúcleos	26
3.3.5 Método de Exclusão por Trypan Blue.....	26
3.4 Ensaio de proliferação celular utilizando a sulforodamina β	28
3.5 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	28

3.6 Avaliação da atividade apoptótica e necrótica por citometria de fluxo.....	29
3.7 Ensaios de ecotoxicidade aguda utilizando o organismo da espécie <i>Daphnia similis</i>	30
3.7.1 Soluções utilizadas	31
3.7.2 Manutenção dos organismos teste	31
3.7.3 Teste de sensibilidade ao cloreto de potássio	32
3.7.4 Teste de toxicidade aguda utilizando o corante Acid Black 210.....	32
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Padronização do método para coloração das lâminas de micronúcleo (MN) utilizando o alaranjado de acridina	34
4.2 Ensaios realizados utilizando o corante Disperse Red 73	35
4.2.1 Determinação das concentrações do corante Disperse Red 73 a serem utilizadas no ensaio de micronúcleo	35
4.2.2 Ensaio de micronúcleo em células HepG2 com o corante Disperse Red 73.....	36
4.3 Ensaios realizados utilizando o corante Acid Black 210.....	39
4.3.1 Determinação das concentrações do corante Acid Black 210 a serem utilizadas no ensaio de micronúcleo	39
4.2.2 Ensaio de micronúcleo em células HepG2 com o corante Acid Black 210	41
4.2.3 Ensaio de proliferação celular pelo método colirimétrico sulforodamina B	43
4.2.4 Avaliação do tipo de morte celular em células HepG2	44
4.2.5 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	46
4.2.6 Ensaio de ecotoxicidade	47
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Os corantes possuem grande importância nos diversos segmentos industriais, sendo utilizados em medicamentos, cosméticos, alimentos, roupas, couros, plásticos, borracha, dentre outros. Estima-se que são produzidos no mundo mais de 7×10^5 toneladas de corantes por ano (KUBERAN et al., 2011; GEETHA; PALANISAMY, 2015) sendo que aproximadamente 26.500 toneladas/ano são consumidas no Brasil (KUNZ et al., 2002; SOUZA; FORGIARINI; SOUZA, 2007). Dessa forma, o mercado mundial de corantes movimenta bilhões de dólares distribuídos entre corantes e pigmentos orgânicos e inorgânicos (ZOLLINGER, 2003).

A produção de corantes, apesar de apresentar grande importância econômica é alvo da preocupação ambiental, uma vez que, parte dos corantes produzidos e utilizados contaminam os corpos d'água (KANT, 2012; ASHFAQ; KHATOON, 2014). Dentre importantes fontes de poluição direta e indireta, temos as indústrias têxteis (CARNEIRO et al., 2004; SEKAR et al., 2012) e as indústrias de curtume (SEKAR et al., 2012).

Nesse cenário, o Brasil tem especial destaque, pois possui mais de 30.000 empresas têxteis instaladas em território nacional, apresentando um faturamento anual de 53 bilhões de dólares, representando o quinto maior parque têxtil do mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO, 2015).

A tecnologia utilizada para o tingimento de fibras e tecidos consiste em diversas etapas que são determinadas de acordo com a natureza da fibra têxtil, características do corante, propriedades de fixação e considerações econômicas (GUARANTINI; ZANONI, 2000).

Durante o processamento têxtil, a ineficiência no tingimento, mais precisamente na etapa de fixação do corante à fibra, resulta em grandes volumes de efluentes contendo corantes (ZANELLA et al., 2010). A quantidade de corante perdido é dependente da classe de corante utilizado na aplicação das fibras, variando de 2% de perda quando se utiliza corantes básicos a 50% de perda para corantes reativos (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004; MANSOUR et al., 2012). Assim, aproximadamente 280.000 toneladas de corantes da indústria têxtil atingem o ambiente aquático por meio do lançamento de efluentes industriais a cada ano no mundo (SARATALE et al., 2011).

As indústrias de curtume representam outra importante fonte de poluição ambiental. O Brasil é um dos maiores centros de produção de couro do mundo. Segundo o IBGE (2014), em 2012 foram adquiridos cerca de 35.000.000 toneladas de couro pelos curtumes brasileiros

movimentando um produto interno bruto (PIB) de UU\$ 3,5 bilhões/ano (CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL, 2010).

O processo de curtimento é um dos mais antigos processos industriais em todo o mundo. Atualmente, essas atividades industriais são baseadas em processos químicos que envolvem vários compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo ácidos, sais de cromo, corantes, auxiliares e outros aditivos químicos (BACCAR et al., 2011). O processo de curtimento do couro passa por diversas etapas e é na fase final que os corantes são adicionados. Esta etapa ocorre em meio aquoso, gerando um volume significativo de águas residuais contendo altas concentrações de corantes (PICCIN et al., 2012, RATNA; PADHI, 2012).

Os corantes comerciais têm uma grande variedade de cores e uma elevada estabilidade à temperatura, à luz e ao ataque microbiano (MODI; RAJPUT; AMBASANA, 2010) e, quando não tratados adequadamente podem afetar os sistemas aquáticos, diminuindo a penetração da luz e a solubilidade dos gases (KUNZ et al., 2002; MODI; RAJPUT; AMBASANA, 2010; ZHANG et al., 2012). Além disso, os corantes podem ser tóxicos para os organismos aquáticos e quando sofrem degradação biótica ou abiótica, seus metabólitos podem ser mutagênicos ou carcinogênicos (KUNZ et al., 2002). Muitos corantes, apesar de terem sido submetidos a uma avaliação toxicológica preliminar à sua utilização, têm se mostrado potencialmente ecotóxicos, genotóxicos e/ou mutagênicos em inúmeros trabalhos da literatura (TSUBOY et al., 2007; CHEQUER; DORTA; OLIVEIRA, 2009; FERRAZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

A legislação ambiental brasileira, por meio das Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) números 357 e 430, de 2005 e 2011, respectivamente (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011) dispõe sobre as condições de lançamentos de efluentes. No entanto, não há legislação específica no Brasil para o descarte de corantes em efluentes das indústrias têxteis e de curtume. A única ressalva neste sentido é que, de acordo com a legislação brasileira vigente, os efluentes industriais devem ser tratados antes de serem lançados no ambiente aquático e os produtos de tratamento, dentre outras exigências, não podem conferir cor aos corpos hídricos receptores. Entretanto, as empresas têxteis e de curtume no Brasil são em sua maioria de pequeno e médio porte, dificultando dessa forma a fiscalização. Assim, parte dos efluentes industriais sem tratamento atinge o ambiente aquático clandestinamente.

Além disso, os tratamentos utilizados para a remoção da cor dos corantes, não garantem que os produtos formados durante o processo de tratamento de efluentes não apresentem efeitos tóxicos e mutagênicos para os seres vivos. Oliveira et al. (2010)

analisaram 3 corantes têxteis antes e após o tratamento por cloração e detectaram que os compostos formados após o tratamento por cloração de 2 corantes analisados apresentavam maior mutagenicidade para as linhagens TA 98 de *Salmonella typhimurium* do que os corante não tratados.

Outro problema que contribui para a presença de corantes em corpos da água é que atualmente os processos de tratamento de efluentes têxteis empregados pelas indústria se baseiam em métodos físicos, químicos e biológicos (RAJKUMAR; SONG; KIM, 2007). No entanto, esses processos convencionais, não são eficientes na remoção de alguns corantes. Shaul et al. (1991) estudaram a eficácia do tratamento convencional utilizados nos efluentes têxteis. Dos 18 azo corantes estudados, 11 passaram através do processo de lodo ativado praticamente inalterados, 4 (Acid Blue 113, Acid Red 151, Direct Violet 9 e Direct Violet 28) foram adsorvidos no lodo ativado e somente 3 (Acid Orange 7, Acid Orange 8 e Acid Red 88) foram biodegradados.

Sabe-se que a qualidade da água tratada para consumo humano depende estritamente da qualidade da água bruta. Um estudo de Umbuzeiro et al. (2005), relatou que o efluente de uma indústria de tingimento foi responsável pela atividade mutagênica no Ribeirão dos Cristais em Cajamar, SP, sendo um resultado preocupante, uma vez que a água era utilizada para consumo por uma população de 60.000 pessoas. O tratamento pelo método do lodo ativado utilizado pela indústria têxtil responsável pela contaminação, não era totalmente eficiente na remoção dos corantes e portanto uma parte desses corantes era descartada como efluentes industriais no rio. Além disso, a água destinada para consumo humano oriunda do Ribeirão dos Cristais continuava apresentando atividade mutagênica, mesmo após o tratamento pela Estação de Tratamento de Água (ETA) (Umbuzeiro et al., 2005). Por conseguinte, frente ao exposto, os estudos envolvendo a avaliação de risco de corantes e seus produtos de degradação são de suma importância para a análise do impacto que esses compostos podem causar para a saúde humana e ao ecossistema. Esses estudos servem também para embasar argumentos que justifiquem alterações na Legislação Brasileira, seja através da proibição da utilização de corantes que causem sérios danos para a saúde humana e para o meio ambiente ou para estabelecer limites seguros de lançamento de efluentes contendo corantes e seus produtos de degradação.

1.1 Os azo corantes

Os azo compostos representam 70% em peso, de todos os corantes orgânicos produzidos no mundo (SARATELE et al., 2011), constituindo a maior classe de corantes sintéticos utilizados em aplicações comerciais (PANDEY; SINGH; IYENGAR, 2007).

Esses compostos aromáticos possuem um ou mais grupos azo ($-N=N-$), sendo este grupo responsável pela sua coloração (PANDEY; SINGH; IYENGAR 2007; MANSOUR et al., 2007). Os corantes dessa classe, por possuírem a característica de serem dificilmente biodegradados em condições aeróbicas (CHUNG, 2000), são considerados não biodegradáveis e persistentes (MOHAN; RAO; SARMA, 2007). Alguns estudos indicam que diversos azo corantes e seus produtos de degradação, principalmente aminas aromáticas podem ser mutagênicos e ou carcinogênicos (CHUNG, 2000; JANGER; HAFNER; SCHNEIDER, 2004) e estes efeitos estão intimamente relacionados com a natureza e posição dos substituintes ligados ao grupo azo (CHUNG; CERNIGLIA, 1992). Desta maneira, pequenas variações estruturais nas moléculas dos corantes alteram as suas propriedades genotóxicas e por isso, é importante que cada corante azo seja testado individualmente (KOJIMA et al., 1991; UMBUZEIRO et al., 2005).

A exposição humana aos azo corantes ocorre através do consumo de água contaminada ou do contato com a pele. Os corantes azo quando entram no organismo humano através da ingestão, podem ser metabolizados pelas azoredutases produzidas pela microflora intestinal gerando aminas aromáticas, que reagem com o DNA (SWEENEY; CHIPMAN; FORSYTHE, 1994, UMBUZEIRO et al., 2005; BAFANA; DEV; CHAKRABART, 2011). Essas aminas aromáticas, também podem ser oxidadas pelo citocromo P450 formando compostos com radicais N-hidroxilas, que quando são acetiladas pelas enzimas O-acetiltransferase, geram íons eletrofílicos de nitrogênio que podem reagir com o DNA formando adutos (UMBUZEIRO et al., 2005). Já quando o organismo é exposto através do contato dérmico, esses corantes poderão ser metabolizados por bactérias presentes na pele, também gerando aminas aromáticas (STAHLMANN et al., 2006).

A exposição a alguns corantes azóicos têm sido associados com o desenvolvimento de câncer de bexiga em humanos e desenvolvimento de tumores e aberrações cromossômicas em mamíferos (MEDVEDEV; CROWNE; MEDVEDEVA, 1988; PERCY; MOORE; CHIPMAN, 1989; FREEMAN; ESANCY; CLAXTON, 1990, MANSOUR et al., 2010; STIBOROVÁ et al., 2013). Além disso, diversos estudos demonstram que alguns azo corantes e seus produtos de degradação geram efeitos tóxicos em organismos aquáticos como *Daphnias sp* (FERRAZ et al., 2010; WANG et al., 2009; VERMA, 2008; BAE;

FREEMAN, 2007) e anfíbios (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2014). Assim, o tratamento de efluentes contendo azo corantes se tornou alvo de grande interesse da comunidade científica nas últimas décadas (MENG et al., 2012).

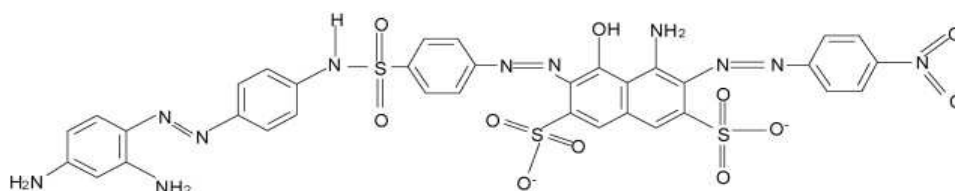
Devido à sua estabilidade, os corantes azo não são totalmente degradados por processos convencionais de tratamento de águas residuais que envolvem a utilização de luz, produtos químicos ou lodos ativados e, portanto, são liberados para o meio ambiente (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004), podendo gerar riscos para o ecossistema e para a saúde humana.

1.2 Corantes estudados

Nesse trabalho foram estudados os corantes Acid Black 210 e o Disperse Red 73, pertencentes à classe dos azo corantes.

O Acid Black 210 é um azo corante frequentemente utilizado no tingimento do couro, algodão e tecido de lã, representando aproximadamente 80 a 90% do corante de cor preta utilizado na indústria (ZHRIM; TIZAOUI; HILAL, 2010). A estrutura química desse corante, representada na Figura 1, é complexa, apresentando diversos grupos funcionais e três grupos azo.

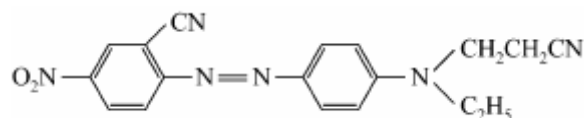
Figura 1. Estrutura química do corante Acid Black 210 (FONTE: ZHRIM; TIZAOUI; HILAL., 2010).



Embora o corante Acid Black 210 seja o principal composto utilizado para conferir cor preta a couros (ZHRIM; TIZAOUI; HILAL, 2010), até o presente momento não existem estudos publicados sobre o potencial genotóxico deste corante e não há estudos de monitoramento da presença desse corante em águas superficiais.

O corante Disperse Red 73, é um corante vermelho frequentemente utilizado na indústria têxtil (Figura 2). Até o presente momento não existem dados na literatura científica sobre o potencial genotóxico desse corante, mas estudos ainda não publicados realizados em nosso laboratório, utilizando o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, demonstraram que o corante Disperse Red 73 induz mutagenicidade através dos mecanismos de deslocamento do quadro de leitura (detectado pela linhagem TA98) e substituição dos pares de bases (detectado pela linhagem TA100) em baixas concentrações. Além disso, o corante Disperse Red 73 apresentou CE_{50} de 0,31 mg/L em ensaios de ecotoxicidade com 48 horas de exposição realizados pelo nosso grupo, utilizando a espécie *Daphnia similis*, sendo portanto classificado como muito tóxico por apresentar $CE_{50} < 1\text{mg/L}$, segundo a *Global Harmonization System* (2013).

Figura 2. Estrutura química do corante Disperse Red 73 (FONTE: JINHUA et al., 2010)



Considerando que os corantes são amplamente utilizados atualmente, que ocorre contaminação ambiental durante a produção e utilização dos corantes e que existem estudos demonstrando que diversos corantes utilizados pelas indústrias têxteis e de curtume são prejudiciais para os seres humanos e para o meio ambiente, nesse trabalho, foi proposta a hipótese de que os corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73 podem apresentar potencial mutagênico e que o corante Acid Black 210 pode apresentar citotoxicidade e ecotoxicidade aguda. Esses estudos, em conjunto com outros resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa fornecem subsídios para que seja realizada uma avaliação de risco da presença desses corantes em águas superficiais.

1.3 Avaliação de Risco

Dentro deste contexto, nosso grupo está realizando diversos ensaios de toxicologia genética e de ecotoxicidade utilizando o corante Acid Black 210 e o corante Disperse Red 73 nas formas comerciais, a fim de se avaliar os possíveis danos à saúde humana e ao ecossistema aquático, contribuindo para a avaliação de risco desses compostos.

A avaliação de riscos ambientais tenta quantificar os riscos à saúde humana e ao ecossistema, gerados a partir de atividades humanas e fenômenos naturais (KIRCHHOFF, 2004), sendo uma importante ferramenta que auxilia na tomada das decisões (CANTER, KNOX 2004), possibilitando minimizar os problemas ambientais e possíveis danos aos seres vivos (KOLLURU, 1994; KIRCHHOFF, 2004). Desta forma, o risco ambiental é de grande importância na avaliação e determinação de alvos de uma política nacional de meio ambiente.

"A avaliação do risco é um processo sistemático pelo qual o perigo, a exposição e o risco são identificados e quantificados" (CORRÊA; ALONZO E TREVISAM, 2003). Essa avaliação é essencial para embasar a análise do risco e garantir a segurança dos seres humanos e outros seres vivos à exposição a determinados compostos.

A avaliação do risco ambiental pode ser realizada através de diversas metodologias, sendo que a mais tradicional possui quatro etapas (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2015):

1. Identificação do Perigo: nessa fase, investiga-se se o agente químico pesquisado apresenta capacidade de causar algum efeito adverso. São importantes para essa etapa estudos com seres humanos, estudos toxicológicos em animais; estudos toxicológicos *in vitro*; estudos da relação estrutura atividade, dentre outros (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2015).
2. Caracterização do perigo: é a caracterização da relação entre a dose e a incidência de efeitos adversos em populações expostas. Durante a avaliação da curva dose-resposta é importante determinar alguns parâmetros quantitativos tais como: a) Concentração de efeito observado (CEO): menor concentração testada no qual se observa algum efeito; b) Concentração de efeito não observado (CENO): maior concentração observada, onde não é observado algum efeito; c) Concentração efetiva (CE₅₀): concentração onde se produz algum efeito em 50 % dos indivíduos submetidos ao teste (CHAZIN E AZEVEDO, 2003) .

Nessa etapa ocorre a seleção de dados críticos, estudos sobre o modo e o mecanismo de ação, a variabilidade cinética, a variabilidade dinâmica e os estudos de dose resposta para efeitos críticos.

3. Avaliação da exposição: é a medição da frequência e intensidade, da frequência e da duração da exposição humana a um determinado agente químico.
4. Caracterização do risco: é a etapa final e envolve a predição da frequência e da severidade dos efeitos adversos numa população exposta, integrando os dados obtidos com a identificação do perigo, caracterização do perigo e da exposição. Nessa etapa, as evidências sobre o risco da exposição a um agente químico, sob determinadas condições são analisadas e quantificadas fornecendo embasamento para que as decisões futuras sejam tomadas (CORRÊA; ALONZO E TREVISAM, 2003).

No presente trabalho, foi realizado estudos da etapa de identificação do perigo de indução de efeitos mutagênicos causados pelos corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73 nas formas comerciais. Além disso, também foram realizados alguns estudos da etapa de identificação do perigo e da caracterização do risco ecotoxicológico do corante Acid Black 210 comercial, através dos ensaios de toxicidade aguda.

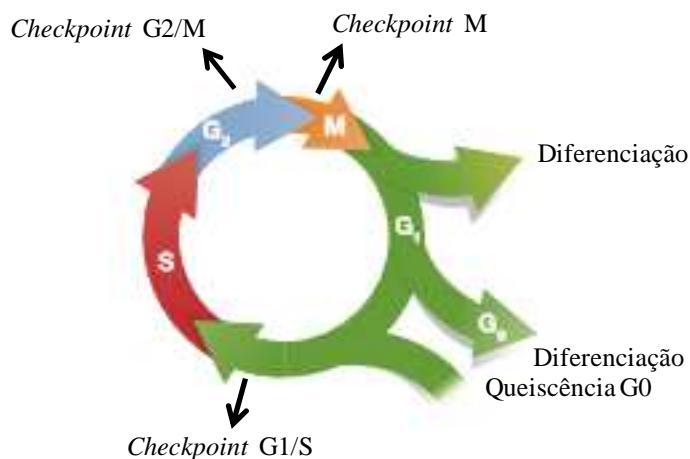
1.4 Ensaios ecogenotóxicológicos

1.4.1 Ciclo celular

O ciclo celular mitótico é um conjunto de eventos controlados por um mecanismo complexo em que ocorre replicação do DNA e posterior divisão celular gerando duas células-filhas geneticamente idênticas (GAURISANKAR; TANYA, 2008; CORLU; LOYER, 2012). O ciclo celular (Figura 3) é constituído pelas etapas de interfase e mitose (M). A interfase corresponde ao período entre o final de uma divisão celular e o início de outra divisão celular e é subdividida em G1 (Gap 1), S (Síntese) e G2 (Gap 2) (GELBERT et al., 2014). A mitose (M) corresponde ao processo que gera duas células filhas e é composta pelas fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase (MORGAN et al., 2010). Nas fases S e M, ocorrem os eventos fundamentais da divisão celular: replicação de uma cópia única e fiel do material genético (Fase S) e divisão de todos os componentes celulares em duas células filhas (Fase M). As demais fases (G1 e G2) representam período de "gap" ou intervalos, nas quais as células se preparam para que ocorra a conclusão bem sucedida das fases S e M, respectivamente (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

As células também podem sair do ciclo de divisão celular e entrar no estado de quiescência conhecido como G0 (CORLU; LOYER, 2012). Nessa fase as células apresentam uma atividade nuclear baixa, mas mantém a capacidade de divisão celular, podendo responder a sinais específicos e voltar a proliferar. As células podem permanecer no estado G0 por horas, dias, semanas ou mesmo anos antes de voltar a proliferar, ou ainda podem permanecer nesse estado permanentemente até que ocorra a morte da célula (HOUTGRAAF et al., 2006).

Figura 3. Representação esquemática das fases S (síntese), M (mitose), G1 e G2 e dos *checkpoints* que ocorrem durante o ciclo celular. Fonte: (SCHWARTZ; SHAH, 2005). Adaptado.



A progressão pelas fases do ciclo celular é um processo altamente controlado que depende da atividade de uma família composta por proteínas reguladoras chamadas de quinases dependentes de ciclina (CDKs) (CORLU; LOYER, 2012; LIM; KALDIS, 2013). Para a ativação das CDKs é imprescindível a presença das ciclinas e durante as fases do ciclo celular, diferentes combinações do complexo ciclinas-quinases são formados. As ciclinas são expressas e degradadas de forma fase dependente e os complexos formados entre ciclinas e quinases, são responsáveis pela fosforilação sequencial da proteína retinoblastoma (pRb) que controla a passagem das fases G₁, S, G₂, M (MALUMBRES, 2011; LIM; KALDIS, 2013).

Outro mecanismo importante de controle do ciclo celular são os chamados *checkpoints*, um mecanismo que impede que as células entrem em uma nova fase do ciclo celular sem que tenham concluído com êxito a fase anterior (MALUMBRES; BARBACID, 2001; FOSTER, et al., 2010). Os *checkpoints* ocorrem no final da fase G₁ (*Checkpoint G₁/S*), no final da fase G₂ (*Checkpoint G₂/M*) e durante a mitose (Figura 3) (HOUTGRAAF et al., 2006; GOTO et al., 2013).

Durante os *checkpoints*, o processo de divisão celular pode ser interrompido até que o problema detectado seja solucionado. A parada temporária do ciclo celular pode ocorrer, por exemplo, para que a célula repare o DNA danificado ou para que ocorra a dissipação de sinais exógenos que geram estresse celular (PIETENPOL; STEWART, 2002; MALUMBRES, 2011). Se o problema detectado não for solucionado, os *checkpoints* podem ativar vias de sinalização que levam à senescência ou à morte celular. As falhas nos *checkpoints* do ciclo

celular podem resultar em mutação gênica, danos no cromossomo e aneuploidia, podendo ocasionar o surgimento de tumores (PIETENPOL; STEWART, 2002).

Intérfase

O ciclo celular é iniciado pela ligação de fatores de crescimento a receptores transmembranas, que ativam os eventos de sinalização intracelulares, promovendo o início da fase G1 (TENGA; LAZAR, 2013). Os complexos ciclina D/CDK são cruciais para que ocorra o acoplamento entre os sinais extracelulares e o ciclo celular. Com os estímulos mitogênicos, os complexos ciclina D/CDK são ativados permitindo a progressão da fase G0 para G1 (MALUMBRES, 2011; JHONSON; SKOTHEIM, 2013)

A fase G1 é caracterizada pela ocorrência de eventos, tais como a síntese de proteínas e RNA, que preparam a célula para que ocorra a duplicação do DNA na fase seguinte (VERMEULEN et al., 2003). Durante a fase G1 ocorre a passagem pelo "ponto de restrição" definido como o ponto onde as células param de responder aos estímulos externos, tais como nutrientes e fatores de crescimento (TENGA; LAZAR, 2013; JHONSON; SKOTHEIM, 2013). Desse modo, quando as condições extracelulares são desfavoráveis, as células na fase G1 que não passaram pelo "ponto de restrição" entram na fase G0, podendo permanecer nesse estado por tempo indeterminado (FOSTER, et al., 2010; GELBERT et al., 2014). As células que passaram pelo "ponto de restrição" não entram em quiescência e inevitavelmente continuam no ciclo celular (JHONSON; SKOTHEIM, 2013). O ponto de restrição é controlado pela pRb que é um supressor tumoral, pois inibe a proliferação celular (MILAGROS; LAZAR, 2013; GELBERT et al., 2014). Quando as condições são favoráveis na fase G1, os níveis de ciclina D aumentam e ativam as CDK4 e CDK6, que fosforilam a pRb, desencadeando a expressão de genes necessários para a passagem pelo ponto de restrição (GLADDEN; DIEHL, 2005; FOSTER, et al., 2010; GELBERT et al., 2014). Ao final da fase G1 ocorre um aumento do complexo ciclina E-CDK2 que permite que as células progridam da fase G1 para a fase S (FOSTER, et al., 2010).

Entre o final da fase G1 e o início da fase S ocorre o *checkpoint* G1, um mecanismo que permite avaliar se o DNA que ainda não foi duplicado possui algum dano. Nesse processo as proteínas p53 são ativadas, resultando na parada do ciclo celular em G1. Se o dano for reparado, ocorre inibição da p53 e passagem para a fase S. Caso o dano no DNA não seja passível de reparo, pode ocorrer a ativação do mecanismo de morte celular programada (GRIVICICH et al., 2007; KONDRATOVA et al., 2015).

Após passar pela fase G1, as células entram na fase "S", onde ocorre a duplicação do DNA (PUCCI et al., 2000). A fase S somente se inicia quando todas as proteínas necessárias para a replicação atingem um nível adequado (VERMEULEN et al., 2003). Nessa fase, para que a replicação tenha início é necessária que ocorra a formação complexo ciclina A- CDK2. (MALUMBRES; BARBACID, 2001), esse complexo atua fosforilando proteínas específicas envolvidas na progressão adequada da sequência de eventos que ocorrem na fase S (BENDRIS et al., 2011).

A fase G2 caracteriza-se pela realização de atividades que preparam a célula para a mitose, tais como a síntese de proteínas e de RNA. Nessa fase ocorre um aumento da ciclina B e a formação do complexo ciclina B-CDK1, necessário para desencadear a mitose. As células na fase G2 são constituídas de cromossomos duplicados e portanto nessa fase as células são tetraplóides (4n). No final da fase G2 ocorre o checkpoint G2/M, um mecanismo que permite avaliar se o DNA sofreu dano durante a replicação. Quando o DNA é danificado, são ativadas vias de transdução de sinais que regulam a reparação do material genético e a progressão do ciclo celular (PIETENPOL; STEWART, 2002; KOUSHOLT et al., 2012). Caso o dano seja reparado ocorre a passagem da fase G2 para a mitose.

Mitose

Após a passagem pela fase G2, as células iniciam a fase da Mitose. A primeira etapa dessa fase é chamada de prófase, quando ocorre a formação e replicação do fuso mitótico no citoplasma e a condensação das cromátides irmãs no núcleo. Em seguida, inicia-se a prometáfase, quando ocorre a desintegração do envelope nuclear, permitindo que os cinetócoros dos cromossomos se liguem aos microtúbulos do fuso mitótico. Inicia-se então a etapa de metáfase, quando os cromossomos se alinham na região equatorial do fuso mitótico, formando a placa metafásica (MORGAN et al., 2010; CIVELEKOGLU-SCHOLEY; CIMINI, 2014). Nessa fase ocorre o ponto de checagem do fuso mitótico (*checkpoint M*), que verifica se todos os cinetócoros dos cromossomos estão ligados aos microtúbulos e se as cromátides irmãs estão ligadas aos microtúbulos provenientes de polos opostos (BALLISTER et al., 2014). O *checkpoint* mitótico impede o início da anáfase até que todos os cinetocoros estejam ligados ao fuso mitótico da forma correta e com a tensão adequada (MENA et al., 2010).

Após esse *checkpoint*, ocorre a anáfase, fase em que as cromátides irmãs se separam de forma sincrônica e formam dois cromossomos filhos, sendo cada um deles lentamente puxados em direção ao polo do fuso. Na próxima etapa, a telófase, ocorre os efeitos da degradação da ciclina B, os cromossomos se descondensam e ocorre a reorganização do

envoltório nuclear. A última fase da divisão celular é denominada citocinese que é caracterizada pela formação de um anel contrátil de actina ocasionando a separação total do citoplasma em duas células filhas (MORGAN et al., 2010; CIVELEKOGU-SCHOLEY; CIMINI, 2015). Assim, se todo o processo de divisão celular ocorrer corretamente, duas células filhas geneticamente idênticas são formadas.

1.4.2 Ensaio de micronúcleo para avaliação de mutações cromossômicas

Os testes de mutagenicidade visam além de detectar alterações no material genético, estudar os mecanismos de mutagênese química, bem como avaliar os perigos da exposição humana a compostos químicos mutagênicos e carcinogênicos (WASSON, MCKELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008).

Vários testes *in vitro* e *in vivo* são empregados atualmente para avaliar o potencial mutagênico de agentes químicos (SANT'ANA, et al., 2015), físicos e biológicos (KANG, et al., 2013). A avaliação da mutagenicidade é realizada através de uma combinação de testes que detectam os principais mecanismos de dano genético: mutações pontuais (deleções e inserções), clastogenicidade (alterações cromossômicas estruturais) e aneuploidia (aberrações cromossômicas numéricas) (EASTMOND et al., 2012). Dentro deste contexto, os testes para avaliação da mutagenicidade *in vitro* têm sido empregados para realização de triagem com o objetivo de avaliar o potencial mutagênico e assim os possíveis danos aos seres vivos (KANG, et al., 2013).

O ensaio de micronúcleo é um dos métodos mais utilizados para a avaliação do dano do DNA cromossômico e é um ensaio padrão nos testes citogenéticos (FENECH, 2007). Os micronúcleos são bioindicadores de efeito clastogênico (que causam a quebra de cromossomos) ou aneugênicos (que induz aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (CARDINALE; BRUZZI; BOLOGNESI, 2012), indicando danos cromossômicos e instabilidade genômica (IARMARCOVANI et al., 2008; LAJMANIVICH et al., 2014). O micronúcleo é definido como uma pequena massa nuclear delimitados por membrana e separados do núcleo principal (SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, 2003). São formados durante a divisão celular, quando fragmentos de cromátides acêntricas, fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros não são incorporados no núcleo principal e são envolvidos, durante a telófase, por um envelope nuclear que gradualmente assume a morfologia de um núcleo (Figura 4). Esses núcleos são visíveis no citoplasma da célula e são menores do que o núcleo celular, por isso recebem a denominação de micronúcleo (FENECH, 2000; FENECH et al., 2011).

Os micronúcleos formados por fragmentos de cromátides e cromossomos acêntricos são originados de falhas na reparação do DNA que sofreu quebra durante o processo de divisão celular, resultando na formação de cromossomos assimétricos. Os micronúcleos formados por cromossomos inteiros são originados da separação incorreta dos cromossomos durante a anáfase que geralmente é causada por falhas no *checkpoint* mitótico, defeitos no cinetócoro, hipometilação do DNA centromérico e defeitos no sistema de controle do ciclo celular (LUZHNA et al., 2013).

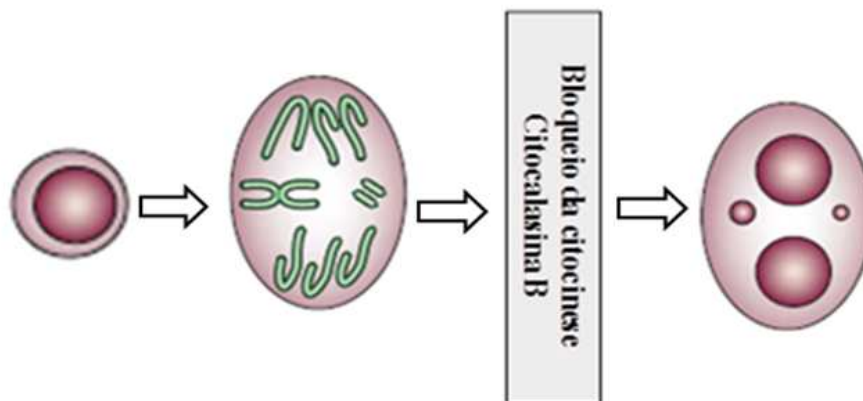
Diversos estudos mostram, uma correlação positiva entre a frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e humanos (CLARE et al, 2006; VAN LEEUWEN, 2011), sendo um ensaio recomendado para a aprovação de novas substâncias por diversas agências regulatórias governamentais.

Ensaio de micronúcleo com o bloqueio da citocinese

Os danos cromossômicos só podem ser expressos como micronúcleos após um ciclo de divisão celular, conseqüentemente a frequência de micronúcleos observada em uma população celular é dependente da proporção de células que se dividem (FENECH, 1997). Desse modo, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células só seria segura quando as cinéticas de divisão celular fossem idênticas. Para sanar essa desvantagem da técnica, recomenda-se a utilização da citocalasina B para o bloqueio da citocinese nos ensaios de micronúcleo (FENECH, 1997).

A citocalasina B, é um inibidor da polimerização da actina, proteína necessária para a formação do anel de microfilamentos que contrai o citoplasma da célula em divisão durante a citocinese sem, contudo, impedir a divisão dos núcleos (Figura 4) (FENECH, 1997; FENECH, 2000; FENECH, 2007). Conseqüentemente, ocorre um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão celular independente da sincronia e da proporção de divisão (FENECH, 2000). A análise das células binucleadas permite uma comparação de danos cromossômicos entre populações que possuem diferenças na cinética de divisão e aumenta a precisão dos resultados, uma vez que seria necessário analisar o dobro de células mononucleadas para obter o mesmo nível de danos observados em células binucleadas (FENECH, 1997).

Figura 4. Formação do micronúcleo através da perda de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros na anáfase e formação de célula binucleada devido ao bloqueio da citocinese. Fonte: FENECH, 2007.



O ensaio de micronúcleo é muito utilizado nos ensaios de toxicologia geral, sendo um método validado e padronizado (VRAL; FENECH; THIERENS, 2011) e pode ser realizado em diferentes tipos de células, como as vegetais, humanas e de outros mamíferos (FENECH, 2000).

1.4.3 Processo de morte celular

A apoptose é um importante mecanismo para a manutenção da homeostase em mamíferos. A desregulação do mecanismo de apoptose pode desencadear diferentes patologias, incluindo doenças autoimunes e neurodegenerativas (quando ocorre um excesso de apoptose) ou o surgimento de tumores (quando ocorre diminuição da apoptose) (ZENG et al., 2015).

A apoptose pode ser induzida por diversos estímulos, tais como danos no DNA, alterações na homeostase da célula ou por substâncias que se ligam aos receptores de superfície de membrana pertencentes à família de receptores do fator de necrose tumoral (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Durante a apoptose, ocorre a participação das caspases, uma família de cisteína que quando ativadas, clivam proteínas presentes no citoplasma e no núcleo da célula (FULDA et al., 2010). No processo apoptótico participam as caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) e iniciadoras (8 e 9) que podem ser ativadas por duas vias: intrínseca e extrínseca (MCLLWAIN et al., 2013). A via intrínseca é desencadeada por estímulos extra ou intracelulares, tais como hipóxia, estresse oxidativo, dano no DNA, desestruturação do citoesqueleto ou modificações citoplasmáticas (MOBAHAT et al., 2014; MCLLWAIN et al.,

2013). Essa via é regulada por proteínas que pertencem à família BCL2 que se divide em membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (TZIFI et al., 2012). Um dos principais fatores que determinam se a célula entra em apoptose em resposta ao estresse é o equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (ELKHOLI et al., 2011). Quando ocorre um deslocamento do equilíbrio em favor dos membros pró apoptóticos, estas proteínas são capazes de se ligar à membrana mitocondrial e provocam a formação de canais permeáveis na membrana, permitindo a liberação de diversas proteínas e dentre elas o citocromo c (MOBAHAT et al., 2014; JAYAKIRAN, 2015). O citocromo c liberado no citoplasma forma um complexo com o APFA1 (fator ativador de protease apoptótica), ATP e caspase 9 iniciadora, formando um complexo denominado apoptossomo. Com a formação desse complexo, as caspases 9 são capazes de ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7 que clivam substratos específicos ocasionando as alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; KIM et al., 2008).

A via extrínseca é iniciada com a ativação de receptores de membrana da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF). Esses receptores são ativados pelos seus ligantes naturais, desencadeando uma cascata bioquímica que culmina na ativação das caspases 8 e 10, que ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 provocando a clivagem das proteínas celulares (KRAUTWALD, et al., 2010).

Tanto para a via intrínseca, como para a via extrínseca, as caspases efetoras 3, 6 e 7 ativadas clivam substratos essenciais para a sobrevivência da célula, tais como as proteínas do citoesqueleto, as proteínas de reparação do DNA, e sub-unidades inibidoras de endonucleases, causando a morte da célula (KOFF et al., 2015). Esses eventos conferem à célula apoptótica uma morfologia característica, quando se observa um encolhimento celular e a condensação da cromatina na fase inicial (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ELMORE, 2007). Nos estágios mais avançados da apoptose ocorre o rompimento do núcleo em um processo chamado de cariorrexia e formação dos corpúsculos apoptóticos, constituído por organelas celulares e fragmentos nucleares (KOLOMECKI et al., 2005). A apoptose ocorre sem processo inflamatório, uma vez que os constituintes celulares são confinados em uma membrana plasmática intacta e nos estágios finais são armazenados nos corpos apoptóticos até serem fagocitados (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Em situações em que ocorre ausência de fagocitose, os corpos apoptóticos podem perder a integridade e nesses casos a apoptose progride para a morte chamada necrose secundária (também chamada de apoptose tardia) (SILVA, 2010; MEVORACH, et al., 2010).

A morte celular por necrose pode ser desencadeada por traumas, exposição a toxinas e danos no DNA (MCCALL, 2010) e está associada com uma rápida perda de integridade de membrana, disfunção mitocondrial e inchaço das organelas, mas é em grande parte desprovida de característica típica de apoptose, incluindo a ativação das caspases (KHAN et al., 2014). Morfologicamente, células necróticas apresentam primeiramente uma aglomeração da cromatina e um inchaço das organelas. Ocorre então um rompimento do núcleo, das mitocôndrias e membrana plasmática (MCCALL, 2010; VANDENABEELE et al., 2010). A necrose é caracterizada por um aumento citosólico da concentração de Ca^{2+} , produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), acidificação intracelular e a depleção de ATP (MCCALL, 2010; NIKOLETOPOULOU et al., 2013). O processo culmina com a morte da célula e a geração de um processo inflamatório que ativa o sistema imune provocando a morte dos tecidos adjacentes (THOMPSON, 2006).

1.4.4 Células HepG2

As células HepG2 originaram de uma linhagem de carcinoma hepatocelular humano e foram isoladas de um menino argentino de 11 anos em 1979. Essas células apresentam morfologia semelhante ao parênquima hepático e possuem a capacidade de manter diversas funções especializadas, que normalmente seriam perdidas em culturas primárias de hepatócitos (MERSCH-SUNDERMANN, 2004). Assim, as células HepG2 sintetizam e secretam muitas proteínas plasmáticas características de um fígado humano normal, mantendo ativas várias enzimas de fase I, tais como diversas isoformas do citocromo P450: 1A1, 1A2, 2B, 2C, 3A e 2E1 e de fase II, como as acetiltransferases, nitroreduases, N-dimetilases, sulfotransferases (KNASMÜLLER et al., 1998). A acetiltransferase é uma enzima envolvida na ativação de amins aromáticas formados pelos compostos do grupamento azo (TSUBOY et al., 2007). Diversas enzimas do fígado humano estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, ativando ou destoxificando substâncias que reagem com o DNA (KNASMÜLLER et al., 1998).

1.4.5 Ensaio de ecotoxicidade aguda

A ecotoxicologia é definida como o “estudo dos efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, que constituem a biosfera” (PLAA, 1982). Essa ciência permite a avaliação de efeitos diretos de toxicantes em espécies modelos, sendo uma ferramenta importante para a avaliação de risco

ambiental (KAHRU; IVASK, 2013), auxiliando na regulamentação, restrição e proibição de novas substâncias químicas (HARRIS et al., 2014).

Os testes ecotoxicológicos são realizados em organismos indicadores, expostos a diferentes concentrações de amostras ou substâncias, em condições experimentais específicas e controladas. São observados os efeitos tóxicos manifestados por alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental (MAGALHAES; FERRÃO FILHO, 2008).

Dentro deste contexto destacam-se os cladóceros que são microcurstáceos zooplancctônicos amplamente utilizados em testes de ecotoxicidade aquática por possuírem grande importância na cadeia alimentar e por serem organismos muito sensíveis a compostos químicos (HANAZZATO; HIROKAWA, 2001; CHANG; SAKAMOTO; HANAZATO, 2005). Além disso, possuem outras características importantes para os bioensaios de ecotoxicidade, como a facilidade de manuseio, estabilidade genética e ciclo de vida curto (ADEMA, 1978; FREITAS; ROCHA, 2011).

Daphnias similis é um cladóceros popularmente conhecido como pulga d' água. Os organismos dessa espécie ocupam importante nível trófico no ecossistema de água doce, uma vez que são consumidores de algas e constituem uma das principais fontes de alimentos para peixes e invertebrados, transferindo energia de produtores primários para os níveis tróficos superiores (CHANG, 2005). Os organismos da espécie *Daphnias similis* apresentam tamanho entre 0,5 a 5 mm e são organismos filtradores, possuindo vários pares de pernas com cerdas que se movimentam e geram uma corrente de água direcionando bactérias, algas e pequenas partículas de material orgânico para a boca (TATARAZAKO; ODA, 2007). Possuem um olho composto, sensível a variações de intensidade de luz, dois pares de antenas ramificadas, que atuam como sensores e como estrutura de locomoção e possuem o corpo recoberto por uma carapaça bivalve transparente (DOMINGUES; BERTOLETI, 2008). A reprodução é por partenogênese, originando populações constituídas inteiramente de fêmeas. No entanto, em condições desfavoráveis, como fotoperíodo encurtado ou falta de alimento, ocorre o aparecimento de machos através da reprodução sexuada. Esses ovos são envoltos por uma casca única de cor escura e rígida, altamente resistentes e são denominados efípios (DOMINGUES; BERTOLETI, 2008).

Nesse trabalho foram realizados testes de toxicidade aguda utilizando a espécie *Daphnia similis*. Esses organismos não são naturalmente encontrados no ecossistema brasileiro, mas os ensaios de ecotoxicidade utilizando essa espécie são recomendados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), sendo comumente utilizada para testes no Brasil (ALMEIDA D, F; MARTINS, A. H; TUNDISI, J.G, 2011).

Os laboratórios de ecotoxicidade mantêm procedimentos rotineiros de utilização de substâncias de referência para a garantia da qualidade analítica de estudos que utilizam os testes de toxicidade agudo (ZAGATTO; BERTOLLETTI, 2006). Desse modo, são realizados testes de sensibilidade (descrito no item Material e Métodos) durante um longo período de tempo e os resultados são representados graficamente na carta controle, sendo esta um importante instrumento para a avaliação do controle de qualidade dos ensaios.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade, mutagenicidade e toxicidade do corante Acid Black 210 e a mutagenicidade do corante Disperse Red 73, contribuindo para a identificação do perigo e caracterização do risco da presença destes corantes em águas superficiais. Para tanto, este trabalho teve como objetivos específicos:

- Avaliar o potencial mutagênico dos corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73, nas formas comerciais através do ensaio de micronúcleo em células HepG2.
- Avaliar a citotoxicidade do corante Acid Black 210 em células HepG2, utilizando o ensaio de proliferação celular;
- Avaliar o efeito do corante Acid Black 210 na progressão do ciclo celular de células HepG2;
- Avaliar a indução da necrose e apoptose pelo corante Acid Black 210 em células HepG2;
- Avaliar a ecotoxicidade aguda do corante Acid Black 210 utilizando a espécie *Daphnia similis* como organismo teste.

3.1 Corantes estudados

O corante Acid Black 210, produzido pela Chemische Fabriek Triade Bv, foi gentilmente cedido pela Eco Vita Indústrias Químicas LTDA. O corante Disperse Red 73 foi comprado da empresa Classic Dyestuff, Inc (EUA). Os corantes estudados possuem as seguintes características:

- **Acid Black 210**
 - Nome Comercial: Triacolor Black TNL-A Concentrado;
 - Pureza: 50-80 %;
 - N° CAS: 85223-29-6;

- **Disperse Red 73**
 - Nome comercial: Disperse Red 73 220%
 - Pureza: 70-80%
 - N° CAS: 16889-10-4

Em todos os ensaios realizados com as células HepG2, o corante Acid Black 210 foi previamente solubilizado no próprio meio de cultura das células (DMEM acrescido de 10% de soro bovino fetal). Nos ensaios de ecotoxicidade aguda, o Acid Black 210 foi solubilizado em meio de cultura dos organismos *Daphnias similis* (Meio MS).

Em todos os ensaios realizados, o corante Disperse Red 73 foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), de forma que durante a realização dos testes, a porcentagem de DMSO nas suspensões celulares fosse inferior a 1 %.

3.2 Cultura de célula HepG2

As células HepG2 foram obtidas da American Type Culture Collection, N° HB 8065 e foram mantidas em meio DMEM, acrescido de 10% de soro bovino fetal, em 5% de CO₂ e 96% de umidade a 37°C. As células foram coletadas por tripsinização e foram rotineiramente monitoradas para evitar a contaminação.

3.2.1 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT em células HepG2

A determinação da concentração máxima dos corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73 a serem utilizadas no ensaio de micronúcleo foi realizada com base na concentração citotóxica dos corantes estudados obtida por meio do ensaio colorimétrico MTT.

O ensaio colorimétrico de MTT avalia a atividade mitocondrial das células. As enzimas mitocondriais das células viáveis reduzem o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT ou sal de tetrazólio) em formazan, formando um sal insolúvel (SIEUWERTS et al., 1995). A quantidade de sal formada pode ser quantificada por espectrofotômetro e usada para indicar a viabilidade celular.

Sendo o MTT um ensaio colorimétrico, inicialmente foi realizada uma caracterização do espectro visível dos corantes estudados, a fim de se avaliar as interferências decorrentes da possível proximidade do comprimento de maior absorção dos corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73 e do comprimento de onda (λ) utilizado na leitura espectrofotométrica do ensaio. Para tanto, foi utilizado um espectrofotômetro UV-vis (CPS-240^a, Shimadzu) e cubeta de quartzo com caminho óptico percorrido de 1 cm, onde se avaliou o perfil do corante Acid Black 210 comercial na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em água deionizada e do corante Disperse Red 73, na concentração de 70 $\mu\text{g/mL}$, em água deionizada na faixa entre $\lambda = 350 \text{ nm}$ e $\lambda = 700 \text{ nm}$, correspondente ao espectro visível.

O ensaio de MTT foi realizado com 5×10^4 células de HepG2/poço em uma placa de 96 poços. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO_2 e 96% de umidade a 37°C durante 24 horas. Após esse período, diferentes concentrações dos corantes foram adicionadas nos poços e as placas foram armazenadas em estufa por 24 horas. Após a lavagem de cada poço com PBS, a fim de retirar os resíduos dos corantes, foi adicionado em cada poço 180 μL de DMEM e 20 μL de solução MTT de 0,5 % e as células foram incubadas por um período de 3 horas. O conteúdo dos poços foi então desprezado e foi adicionado DMSO e glicina. A absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de placas de ELISA (microenzyme-linked immunosorbent assay). Como controle positivo foi utilizado o carbonil-cianeto-p-trifluorometoxifenil-hidrazona (CCCP) na concentração de 10 μM . Como controle negativo foi utilizado o meio DMEM contendo 10 % de soro bovino fetal nos ensaios com o corante Acid Black 210 e DMSO na concentração de 0,5 % nos ensaios com o corante Disperse Red 73.

3.3 Ensaio de micronúcleo em culturas de células HepG2

3.3.1 Padronização do método de coloração das lâminas de micronúcleo utilizando o corante alaranjado de acridina

O alaranjado de acridina é um corante catiônico fluorescente que possui alta afinidade pelas moléculas de ácidos nucleicos (MOLDOVEANU, 2010), interagindo com o DNA por

intercalação e com o RNA por atração eletrostática. Quando ligado ao DNA, apresenta excitação máxima em 502 nm e emissão máxima em 525 nm, emitindo luz verde. Quando ligado ao RNA, o alaranjado de acridina apresenta excitação máxima em 460 nm e emissão máxima em 650 nm, emitindo luz vermelha (POLARD et al., 2011). Esse corante também interage com componentes ácidos das organelas citoplasmáticas da célula, emitindo luz laranja, quando excitado com comprimento de onda correspondente a luz azul. Assim, utilizando o alaranjado de acridina como corante, o núcleo e o micronúcleo emitem fluorescência verde-amarelada e o citoplasma emite fluorescência laranja-avermelhado (HEDDLE et al., 2011).

Para a padronização, as lâminas de micronúcleo de células de HepG2, previamente preparadas, foram coradas utilizando-se diferentes concentrações de soluções alaranjado de acridina em PBS: 10 µg/mL, 12,5 µg/mL, 18 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL e 40 µg/mL. Para cada concentração de corante utilizado, foram testados os seguintes tempos de exposição das lâminas ao corante: 5 min., 3 min., 1 min., 30 seg. e 15 seg. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Coleman-N120T-IM), equipado com filtro de excitação azul de 450-480 nm.

3.3.2. Protocolo do ensaio de micronúcleo em células HepG2

O teste de micronúcleo com os corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73 foram realizados em diferentes concentrações para avaliação do potencial mutagênico em células HepG2, seguindo o protocolo de Natarajan e Darroudi (1991) com pequenas modificações.

A faixa de concentração a ser testada foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT descrito no item 3.2.1. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram testadas diferentes concentrações dos corantes, variando de 0,05 a 1000 µg/mL para o Acid Black 210 e de 0,05 a 46,5 µg/mL para o Disperse Red 73.

Após a contagem celular utilizando a câmara de Neubauer, 5×10^5 células de HepG2 foram incubadas com 5 mL de meio de cultivo em estufa a 37° C, com 5% de CO₂ por 24 horas. Após as 24 horas foi realizado o tratamento das culturas com 5 diferentes concentrações de cada corante estudado e também com os controles.

Como controle positivo foi utilizado o metilmetanosulfonato (MMS) na concentração de 22 mg/mL para os ensaios utilizando o corante Acid Black 210 e a doxorubicina 0,015 µg/mL para os ensaios com o corante Disperse Red 73. A utilização de dois compostos químicos diferentes como controle positivo nos ensaios de micronúcleo ocorreu em decorrência da disponibilidade desses reagentes no laboratório no momento do teste.

Os frascos foram incubados por mais 20 horas. Após as 44 horas, foram desprezados os meios de cultivo de cada frasco e estes foram lavados com 5 mL de PBS. Em cada frasco foram adicionados mais 5 mL de meio de cultivo à 37°C e 50 µL de citocalasina B (300 µg/mL), 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). Os frascos foram incubados por mais 28 horas. As células foram lavadas duas vezes com PBS, sendo que a primeira lavagem foi reservada (tubo de centrífuga) e a segunda descartada. Em cada frasco foi adicionado 1,0 mL de tripsina 0,1%. Após o despreendimento das células, a tripsina foi inativada pelo soro bovino fetal contido no meio, que foi reservado em tubo cônico de 15 mL. Após esse procedimento, a suspensão celular foi transferida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para um tubo cônico de 15 mL e este foi centrifugado (por 5 min à 212 g). Depois desse procedimento o sobrenadante foi retirado e após homogeneização foi realizado o teste de viabilidade celular usando o método de exclusão do azul de tripan, descrito no item 3.3.5. O ensaio somente foi prosseguido quando a viabilidade celular foi superior a 80%. Em seguida foram adicionadas à suspensão celular, 5 mL de solução de citrato (1%) gelada (4 °C) e 25 µL de formol. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado até restar 0,5 mL. Após homogeneização do *pellet*, foram adicionados 5 mL de fixador metanol/ácido acético. O tubo foi centrifugado e o fixador foi retirado com uma pipeta Pasteur, deixando uma quantidade suficiente para a confecção das lâminas (aproximadamente 0,5 a 0,3 mL). As lâminas foram coradas com alaranjado de acridina 10 µg/mL em tampão fosfato (PBS) por 1 minuto. Em cada experimento realizado, para cada concentração testada, foram contadas 2000 células binucleadas e um total de 500 células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleares, obedecendo aos critérios da OECD (guideline 487, 2015). Para o reconhecimento do micronúcleo foram utilizados os critérios estabelecidos por Fenech; Neville; Rinaldi (1993).

Com os resultados obtidos foi possível calcular índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC):

$$IPBC = \frac{[(M1) + 2(M2) + 3 (MM)]}{N}$$

Onde M1 representa o número de células com 1 núcleo, M2 representa o número de células com 2 núcleos, MM representa o número de células com 3 ou mais núcleos e N representa o número total de células contadas.

3.3.3 Critérios estabelecidos para realizar o teste de micronúcleos (FENECH, NEVILLE & RINALDI, 1993; FENECH et al., 2003).

No ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese, as células utilizadas para avaliação da frequência de micronúcleo devem apresentar as seguintes características:

- As células 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, na intensidade e no molde 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 sobreporem-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.

3.3.4 Critérios para o reconhecimento de micronúcleos (FENECH et al., 2003)

Os micronúcleos (MNs) devem apresentar as seguintes características:

- O 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);
- MNs apresentam formato redondo ou oval;
- MNs não são refráteis;
- MNs não estão ligados ou conectados ao núcleo principal;
- MNs podem tocar, mas não podem sobrepor o núcleo principal e o limite micronuclear deve ser distinguível do limite nuclear;
- MN geralmente tem a mesma intensidade de cor do núcleo principal.

3.3.5 Método de exclusão por azul de tripan

A avaliação da viabilidade celular durante o ensaio do micronúcleo foi realizada através do método de exclusão por azul de tripan (Tennant, 1964). Esse método baseia-se no fato de que as células inviáveis apresentam comprometimento da funcionalidade da

membrana plasmática permitindo a entrada do corante azul de tripan dentro da célula. Assim as células inviáveis se coram em azul enquanto as viáveis permanecem sem coloração.

Uma solução de azul de tripan a 0,25% em PBS foi adicionado à uma alíquota de suspensão celular na proporção de 1:1. Após a homogeneização, a câmara de Neubauer foi preenchida e foi realizada a contagem de 100 células (viáveis e inviáveis) em microscópio óptico, em aumento de 400X.

3.4 Ensaio de proliferação celular utilizando a sulforodamina β

Esse método baseia-se no fato de que o corante sulforodamina β possui grupos sulfônicos que se ligam à aminoácidos de proteínas celulares. Essa ligação é estequiométrica e a quantidade de corante sulforodamina β extraído da célula durante o teste é proporcional à quantidade de proteína celular (Nedel et al, 2011).

Esse ensaio foi realizado com base no protocolo de Shekan, 1990. Foram plaqueadas 5×10^4 células HepG2 por poço em uma placa de 24 poços. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ e 96% de umidade a 37°C durante 24 horas. Após esse período, diferentes concentrações do corante Acid Black 210 (variando de 250 a 2000 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas nos poços. Como controle positivo utilizou-se o terc-butil hidroperóxido na concentração de 100 μM . A placa foi incubada por mais 24 horas e em seguida todo conteúdo líquido foi descartado de cada poço. As células foram então lavadas com PBS por 2 vezes e em seguida foram lavadas uma vez com água milli Q. Foi adicionado em cada poço uma solução de metanol/ácido acético e a placa foi incubada por um período de 2 horas à temperatura ambiente para a fixação das células. Após esse período o conteúdo líquido dos poços foi desprezado e foram adicionados 500 μL de solução de sulforodamina β . As células ficaram em contato com esse corante pelo período de 1 hora. Em seguida, os poços foram lavados com uma solução de ácido acético (1% em água) para a retirada do excesso do corante sulforodamina β . Em seguida foi adicionado em cada poço 1 ml de solução de tampão Tris (pH 10) e a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de placas de ELISA (*microenzyme-linked immunosorbent assay*).

3.5 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

O ciclo celular das células HepG2 expostas à diferentes concentrações do corante Acid Black 210 foi avaliado utilizando-se o marcador iodeto de propídeo (PI). Esse marcador é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente às duplas fitas de DNA, possibilitando a quantificação do conteúdo de DNA presente em uma população de células. Assim na fase S do ciclo celular, ocorre a replicação do DNA e por isso a população de células nessa fase do ciclo celular emitem sinais de intensidade maior do que as células na fase G₀/G₁ (2n). Na fase G₂/M, o DNA está completamente duplicado (4n) emitindo sinais com intensidades maiores do que a fase S (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

O ensaio do ciclo celular foi realizado de acordo com a metodologia de Brylan (1982) e Crissman (1973) com algumas modificações.

Foram plaqueadas 2×10^5 células HepG2 por poço em uma placa de 12 poços. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ e 96% de umidade a 37°C durante 24 horas. Após esse período, diferentes concentrações do corante Acid Black 210 foram adicionadas nos poços. Como controle positivo utilizou-se a cisplatina na concentração de 24 µg/mL e como controle negativo foi utilizado 500 µL do meio de cultura (DMEM acrescido de 10 % de soro bovino fetal). A placa foi incubada por mais 24 horas e em seguida os meios de cultivo presente em cada poço foram reservados em tubo cônico de 15 mL. Cada poço foi lavado com 1 mL de PBS por 3 vezes. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tripsina 0,1 %. Após o desprendimento das células, o meio de cultura reservado em cada tubo cônico de 15 mL foi adicionado nos poços, uma vez que o soro bovino fetal presente no meio de cultura inibe a ação da tripsina. As células foram em seguida centrifugadas a 212 g por 5 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado com 500 µL de PBS gelado (4 °C). Em seguida foi adicionado 500 µL de etanol 100 % e a solução foi homogeneizada utilizando uma pipeta de Pasteur. Após esse procedimento as células ficaram incubadas no gelo por um período de 30 minutos e adicionou-se 1 mL de soro bovino fetal para a remoção dos *debris* de célula. As células foram centrifugadas a 212 g por 5 minutos, a 4° C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com uma pipeta de Pasteur e descartado. Adicionou-se em cada tubo cônico 2 ml de PBS gelado (4 °C) e o *pellet* foi solubilizado com o auxílio de um vortex. Após a centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente o sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado. Em cada tubo cônico de 15 mL foi adicionado 1 µL de RNase 10 mg/mL e 333 µL de PBS gelado. As células foram incubadas em banho maria a 37° C por um período de 15 minutos. Em seguida, os tubos cônicos de 15 mL foram protegidos da luz e foi adicionado 125 µL de solução de PI 0,1 % em solução tampão (pH 7,4). Os tubos cônicos de 15 mL foram agitados no vortex e as células foram incubadas por 30 minutos. Após esse período realizou-se a leitura em citômetro de fluxo BD FACSCanto I e os dados obtidos foram analisados no programa Prima 4.0. Os resultados foram expressos em porcentagem de média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S, G2/M.

3.6 Avaliação da atividade apoptótica e necrótica por citometria de fluxo

Para esse ensaio foi utilizado o fluorocromo Anexina V- FITC e o iodeto de propídeo (PI), marcadores necessários para diferenciar a necrose e apoptose.

A anexina V é uma proteína dependente de cálcio com uma elevada afinidade ao fosfolípídeo fosfatidilserina. Em células viáveis, o fosfolípídeo fosfatidilserina localiza-se na

face citosólica da membrana plasmática e não está disponível para a ligação da anexina V. No entanto, durante o processo de apoptose, a fosfatidilserina é transportada para o exterior da membrana, onde pode ligar-se com Anexina V. Compostos fluorescentes são conjugados com a anexina e se ligam com a fosfatidilserina sendo utilizados como indicadores das fases iniciais da apoptose (ZENG et al., 2015). A morte celular por necrose pode ser detectada utilizando o iodeto de propídio, um corante que possui altas afinidades por moléculas de DNA e RNA. Esse corante não consegue atravessar a membrana plasmática em condições normais. No entanto, durante a necrose a membrana plasmática torna-se permeável permitindo a entrada do PI na célula (ZIEGLER, 2004).

Foram plaqueadas 1×10^5 células HepG2 por poço em uma placa de 12 poços. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ e 96% de umidade a 37°C durante 24 horas. Após esse período, diferentes concentrações do corante Acid Black 210, variando de 1500 a 4000 µg/mL foram adicionadas nos poços. Como controle positivo utilizou-se a cisplatina na concentração 48 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado 500 µl do meio de cultura (DMEN enriquecido com 10 % de soro bovino fetal. A placa foi incubada por mais 24 horas e em seguida os meios de cultivo presente em cada poço foram reservados em tubo cônico de 15 mL. Cada poço foi lavado com 1 mL de PBS por 3 vezes. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tripsina 0,1 %. Após o desprendimento das células, o meio de cultura reservado em cada tubo cônico foi adicionado nos poços, uma vez que o soro bovino fetal presente no meio de cultura inibe a ação da tripsina. As células foram em seguida centrifugadas a 212 g por 5 minutos, a 4° C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* presente em cada tubo cônico foi ressuscitado com 1 mL de PBS gelado (4 °C). As células foram novamente centrifugadas a 212 g por 5 minutos, a 4° C, o sobrenadante de cada tubo cônico foi descartado e foi adicionado em todos os tubos, com exceção do branco, 100 µL de anexina 1 % diluído em tampão de ligação (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM CaCl₂, pH 7,4). A suspensão celular foi transferida para os tubos de citometria e 100 µL de solução de iodeto de propídeo (5 µg/mL) em tampão de ligação foram adicionados em cada tubo. Para a leitura foi utilizada citômetro de fluxo BD FACSCanto I.

3.7 Ensaios de ecotoxicidade aguda utilizando os organismos da espécie *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados em parceria com a Divisão de Laboratórios de Ribeirão Preto da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) sob a supervisão de Dr. Eduardo Angelino Savazzi, seguindo a Norma ABNT NBR12713/2009 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2009).

3.7.1 Soluções utilizadas

- Água de cultivo e diluição - Meio MS (KEATING, 1985).

Esse meio foi preparado adicionando-se para cada litro de água ultrapura 5,00 mL das soluções estoque 1 e 2; 4,00 mL da solução estoque 4 e 1,00 mL das soluções estoque 3, 5, 6 e 7.

➤ Solução estoque 1: 10,00 g de nitrato de sódio (NaNO_3), 1,7183 g de silicato de sódio (Na_2SiO_3), 1,8125 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e 2,00 g de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) foram dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

➤ Solução estoque 2: 2,00 g de cloreto de potássio (KCl) e 5,1455 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

➤ Solução estoque 3: 24,4769 g de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 500,00 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

➤ Solução 4: 2,50 g de EDTA; 2,80 g ácido bórico (H_3BO_3), 0,5803 g de cloreto de ferro anidro (FeCl_3); 0,36 g de cloreto de manganês tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 0,3035 g de cloreto de lítio (LiCl); 0,071 g de cloreto de rubídio (RbCl); 0,1517 g de cloreto de estrôncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); 0,0321 g de brometo de sódio (NaBr); 0,063 g de molibdato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,0336 g de cloreto de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,026 g de cloreto de zinco (ZnCl_2); 0,0101 g de cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 0,0033 g de iodeto de potássio (KI) foram dissolvidos em 2.000 mL de água ultrapura. A solução foi armazenada em frasco âmbar por até 1 mês a 4 °C.

➤ Solução 5: 0,0014 g de dióxido de selênio (SeO_2) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida por até 1 mês a 4 °C.

➤ Solução 6: 0,0011 g metavanadato de amônio (NH_4VO_3) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida a 4 °C por até 1 ano.

➤ Solução 7: 0,0010 g de cianocobalamina (Vitamina B12) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi congelada por até 15 dias e descongelada apenas no momento de preparo do meio MS.

3.7.2 Manutenção dos organismos teste

As *Daphnia similis* foram cultivadas em meio MS, apresentando pH entre 7,0 e 7,6 e dureza entre 40 e 48 mg CaCO_3/L . Os organismos foram mantidos em incubadora sob

temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e foram alimentadas diariamente com $3,2 \times 10^6$ células de algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e 0,02 mL de solução de ração para peixe Tetramim (1g/100 mL) por organismo/dia. A troca do meio de cultivo foi realizada 2 vezes por semana. As culturas foram mantidas no laboratório até a idade de 28 dias.

3.7.3 Teste de sensibilidade ao cloreto de potássio

A sensibilidade das culturas de *Daphnia similis* foi avaliada mensalmente utilizando o cloreto de potássio (KCl) como substância de referência. Os organismos foram expostos ao sal nas concentrações de 370, 480, 620, 800 e 1000 mg/L e foi utilizado como controle negativo o meio MS. Em cada frasco foram adicionados o meio MS, 5 organismos testes com idade de 6 a 24 horas e KCl, de forma que o volume final foi de 10 mL. Para a validação dos resultados, a porcentagem de organismos imóveis do controle negativo não deve exceder 10 %.

Cada concentração foi testada em quadruplicata com 5 organismos em cada frasco. Os testes foram mantidos durante 48 horas em sistema estático, a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, sem iluminação e alimento. Após esse período, os organismos imóveis foram contabilizados.

3.7.4 Teste de toxicidade aguda utilizando o corante Acid Black 210

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar, utilizando as concentrações de 0,1; 1,0; 10; 50; 75 e 100 mg/L do corante Acid Black 210 para determinar a faixa de concentração que causa toxicidade nos organismos.

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições do teste de sensibilidade. Em cada frasco foram adicionados 5 organismos testes e 10 mL de amostra de corantes ou controle negativo (meio MS). Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os organismos testes foram incubados por 48 horas, sem iluminação e alimento. Para a validação dos resultados, a porcentagem dos organismos imóveis no controle negativo não pode exceder 10%. No início e final dos ensaios foram monitorados os valores de pH e oxigênio dissolvido das amostras e controle negativo, pois essas variáveis podem interferir nos resultados.

3.8 Análise estatística

Os resultados dos ensaios de micronúcleo, avaliação do tipo de morte celular e avaliação do ciclo celular foram estatisticamente avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Dunnett ($\alpha=0,05$), com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.0.

Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, CE₅₀ foram calculadas através do método estatístico Trimmed Spearman- Karber com um intervalo de confiança de 95 % (HAMILTON; RUSSO; THRSTON, 1997).

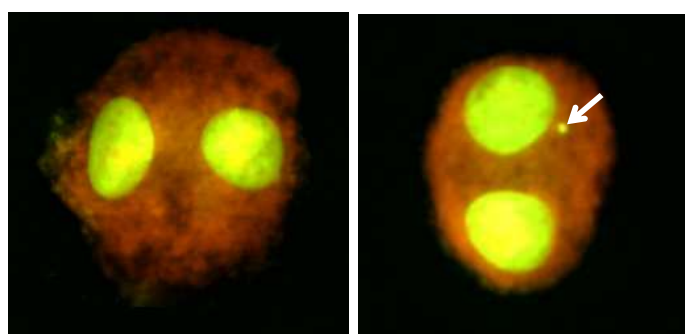
4 RESULTADOS

4.1 Padronização do método para coloração das lâminas de micronúcleo (MN) utilizando o alaranjado de acridina

A padronização da coloração das lâminas de micronúcleo utilizando o corante alaranjado de acridina foi realizada testando diferentes concentrações desse corante e variados tempos de exposição entre o corante e a lâmina para avaliação do micronúcleo.

O melhor resultado obtido para a coloração das lâminas de micronúcleo foi utilizando o corante alaranjado de acridina na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ durante o tempo de exposição de 1 minuto. Como pode ser observado na Figura 6, as células coradas nessas condições apresentaram citoplasma com coloração laranja avermelhado e os núcleos e micronúcleo com coloração verde-amarelado, atendendo dessa forma as características de coloração esperadas, como o descrito no item 3.3.1 (Material e Método). Com o resultado obtido, foi padronizada a utilização do corante alaranjado de acridina na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ durante o tempo de exposição de 1 minuto (Figura 6), para a realização da análise das lâminas obtidas nos ensaios de micronúcleo.

Figura 6. Células HepG2 binucleadas obtidas no ensaio de micronúcleo, coradas com o corante alaranjado de acridina na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, durante o tempo de exposição de 1 minuto. Aumento de 400X. (A) Célula binucleada sem micronúcleo, obtidas no controle negativo (500 μL de PBS). (B) Célula binucleada, contendo um micronúcleo (indicado pela seta branca), obtida com a exposição das células a 0,015 $\mu\text{g/mL}$ de doxorrubicina.



(A)

(B)

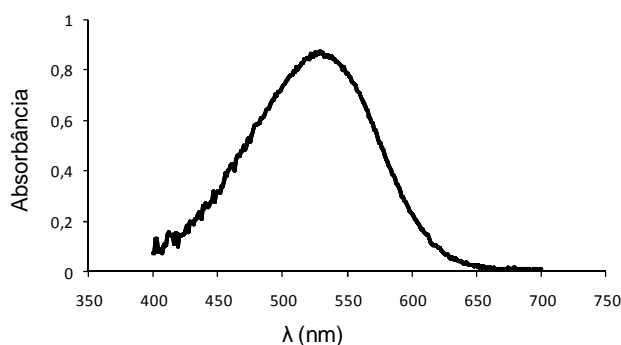
4.2 Ensaios realizados utilizando o corante Disperse Red 73

4.2.1 Determinação das concentrações do corante Disperse Red 73 a serem utilizadas no ensaio de micronúcleo

O ensaio de MTT foi realizado a fim de se determinar a concentração citotóxica do corante Disperse Red 73 e assim estabelecer a concentração máxima desse corante a ser empregado no ensaio de micronúcleo. Sendo o ensaio de MTT um ensaio colorimétrico, foi realizada uma caracterização do espectro visível do corante estudado, a fim de se avaliar as interferências decorrentes da possível proximidade do comprimento de maior absorção do corante Disperse Red 73 comercial e do comprimento de onda (λ) utilizado na leitura espectrofotométrica do ensaio.

Como pode ser observado na Figura 7, o corante Disperse Red 73 comercial possui a banda de maior absorção ($\lambda=525$ nm) muito próxima ao comprimento de onda que deve ser utilizado para o ensaio de MTT ($\lambda=570$ nm), indicando-se assim uma possível interferência durante a leitura espectrofotométrica do ensaio.

Figura 7. Espectro de absorção visível do corante Disperse Red 73, na faixa de comprimento de onda (λ) de 400-700 nm.



O ensaio de MTT foi realizado utilizando-se diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Durante a realização do teste, na etapa de lavagem das células com PBS, para a retirada dos resíduos do corante, foi observado que nos poços que continham concentrações de Disperse Red 73 maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$, a lavagem com PBS não era suficiente para retirar o corante. Em consequência desse fato, foi observado que na etapa de ressuspensão do sal de formazan, os poços que foram tratados com concentrações do corante Disperse Red 73 acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma coloração avermelhada, indicando uma mistura entre a coloração roxa proveniente da formação do sal de formazan possivelmente formado, com a coloração avermelhada do corante Disperse Red 73. Assim, os resultados obtidos a partir da caracterização

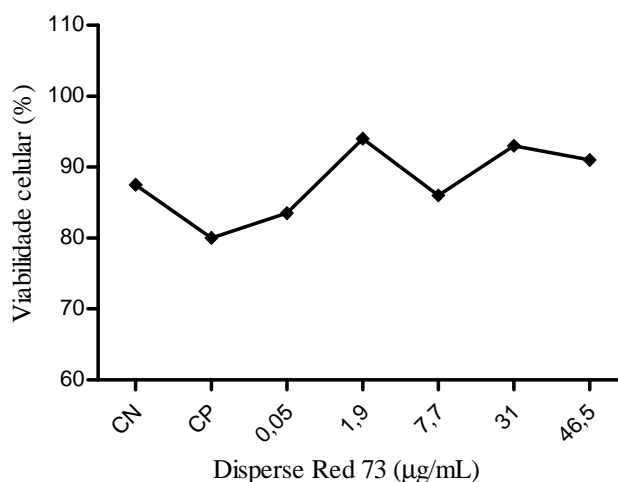
do espectro visível do corante Disperse Red 73 juntamente com as observações realizadas durante o ensaio de MTT, indicaram que a utilização do ensaio de MTT para a determinação da concentração citotóxica do corante Disperse Red 73 não era confiável.

Dessa forma, a determinação da faixa de concentração a ser utilizada no ensaio de micronúcleo para o corante Disperse Red 73 foi realizada com base nos resultados obtidos por outro integrante do nosso grupo de pesquisa que realizou o ensaio da atividade apoptótica e necrótica do Disperse Red 73 em citômetro de fluxo (dados não mostrados). Como resultado desse ensaio, obteve-se que a concentração de 62 $\mu\text{g/mL}$ do corante estudado induziu a morte de aproximadamente 50 % das células. Assim, determinou-se que os ensaios de micronúcleo seriam realizados com concentrações do Disperse Red 73 inferiores a 62 $\mu\text{g/mL}$. Inicialmente, a fim de observar o perfil de efeito do corante estudado, os ensaios de micronúcleo foram realizados com as concentrações de 0,05; 1,9; 3,9; 7,7; 15,5; 31; 46,5 e 62 $\mu\text{g/mL}$ do corante Disperse Red 73. Como resultado, obteve-se que nas concentrações de 62 $\mu\text{g/mL}$, as lâminas de micronúcleo apresentavam uma baixa quantidade de células, não sendo possível contar as 2000 células binucleadas e, portanto essa concentração foi excluída do ensaio de micronúcleo. As menores concentrações 0,05; 1,9 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$ foram utilizadas para investigar se o corante Disperse Red 73 causava o efeito hormesis. Os resultados dos testes preliminares mostraram que não ocorreu aumento significativo da frequência de micronúcleo com relação ao controle negativo para nenhuma das concentrações de Disperse Red 73 testadas. Assim, para realização dos ensaios em triplicada definiu-se que seriam testadas as concentrações de 46,5; 31; 7,7; 1,9 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.2 Ensaio de micronúcleo em células HepG2 com o corante Disperse Red 73

Durante a realização de cada ensaio de micronúcleo, após a etapa de tripsinização das células, foi realizada a avaliação da viabilidade celular pela técnica de exclusão do corante azul de tripan, a fim de se determinar, se a porcentagem de células viáveis era suficiente para dar prosseguimento com o ensaio de micronúcleo. Esse ensaio foi realizado após o tempo de 24 horas de contato entre as células HepG2 e o corante Disperse Red 73. A Figura 8, apresenta o resultado da análise da viabilidade celular expresso em porcentagem de células viáveis, para as culturas de células HepG2 tratadas com as concentrações de 0,05, 1,87, 7,75, 31 e 46,5 $\mu\text{g/mL}$ do corante Disperse Red 73. Como pode ser observado, todas as concentrações do corante Disperse Red 73 utilizadas apresentaram uma viabilidade celular superior a 80 %.

Figura 8. Método de exclusão pelo azul de tripan para verificar a viabilidade celular das culturas HepG2 tratadas com o corante Disperse Red 73. Os resultados representam a média de três repetições.



A Tabela 1 representa a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições do ensaio de micronúcleo e contém informações sobre o número de MN encontrados em 2000 células binucleadas por concentração testada em cada teste realizado, o índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) e a porcentagem de células binucleadas em culturas de células HepG2, tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 73.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos resultados obtidos no teste de micronúcleo em três repetições, para a análise do total de micronúcleos (MN), da porcentagem de células binucleadas (% BN) e do índice de proliferação do bloqueio da citocinese (IPBC) em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Como controle positivo foi utilizado doxorrubicina na concentração de 0,015 µg/mL.

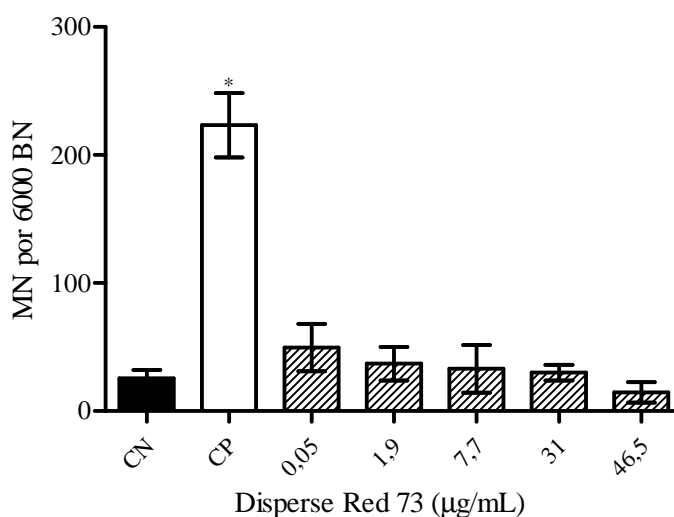
* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).

Tratamentos µg/mL	MN (média ± DP)	% BN (média ± DP)	IPCB (média ± DP)
Controle negativo	25,7 ± 6,51	33,90 ± 13,56	1,36 ± 0,15
Doxorrubicina	226,7 ± 25,17 *	34,42 ± 5,35	1,39 ± 0,07
0,05	36,3 ± 29,37	35,61 ± 8,04	1,39 ± 0,09
1,9	37,0 ± 13,08	36,42 ± 7,01	1,40 ± 0,07
7,7	33,0 ± 18,73	40,86 ± 6,82	1,44 ± 0,06
31	30,0 ± 6,08	47,35 ± 8,01	1,51 ± 0,08
46,5	14,67 ± 8,02	44,55 ± 9,61	1,48 ± 0,11

A Figura 9 apresenta o número total de micronúcleos induzidos pelos controles e por diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Como pode ser observado na Figura 9 e na Tabela 1, os resultados indicam que nas concentrações avaliadas, o corante Disperse Red 73 não induziu um aumento significativo no número total de micronúcleos em relação ao controle negativo.

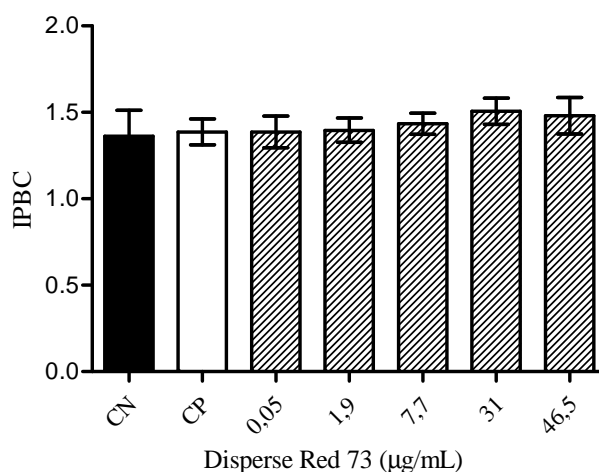
Figura 9. Indução de micronúcleos (MN) nas células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Como controle positivo (CP) foi utilizado a doxorrubicina na concentração 0,015 $\mu\text{g/mL}$. Em cada repetição foram analisadas 2000 células binucleadas e os resultados expressam a média e o desvio padrão de três repetições independentes ($n=3$).

*Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).



A Figura 10 mostra o resultado do índice de proliferação celular do bloqueio da citocinese (IPBC) para cada concentração do corante Disperse Red 73 testado. De acordo com a Figura 10 e com a Tabela 1, pode-se observar que os índices de proliferação do bloqueio da citocinese das células tratadas com o corante estudado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo.

Figura 10. Índice de proliferação celular do bloqueio da citocinese (IPBC) das culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Disperse Red 73. Os resultados expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 500 células. Como controle positivo (CP) foi utilizada a doxorrubicina na concentração 0,015 $\mu\text{g/mL}$. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas das concentrações do corante Disperse Red 73 e controle positivo, com relação ao controle negativo.

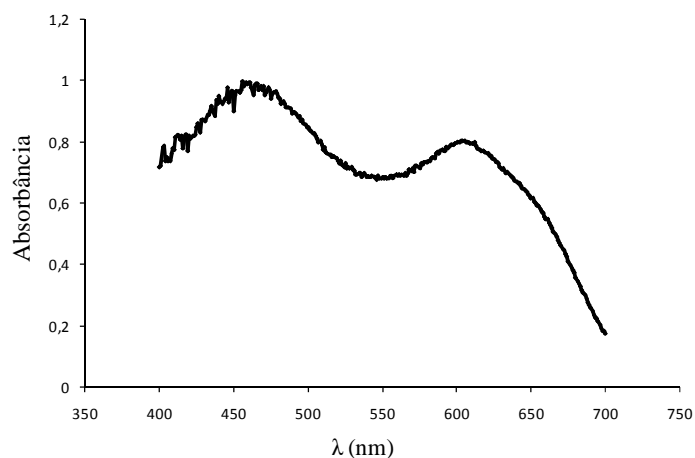


4.3 Ensaios realizados utilizando o corante Acid Black 210

4.3.1 Determinação das concentrações do corante Acid Black 210 a serem utilizadas no ensaio de micronúcleo

O ensaio de MTT foi realizado a fim de se determinar a concentração citotóxica do corante Acid Black 210 e assim estabelecer a concentração máxima a ser empregada no ensaio de micronúcleo. Foi realizada uma caracterização do espectro visível do corante estudado, a fim de se avaliar as interferências decorrentes da possível proximidade do comprimento de maior absorção do Acid Black 210 e do comprimento de onda (λ) utilizado na leitura espectrofotométrica do ensaio de MTT. Como pode ser observado na Figura 11, o corante Acid Black 210 apresentou duas bandas de maior absorção ($\lambda = 450 \text{ nm}$ e $\lambda = 608 \text{ nm}$) e também apresentou absorção na região de comprimento de onda próximo a $\lambda = 570 \text{ nm}$ (comprimento de onda utilizado para a leitura espectrofotométrica no ensaio do MTT), assim pressupõe-se, que ocorreria interferência na leitura do ensaio.

Figura 11. Espectro de absorção visível do corante Acid Black 210 comercial, na faixa de comprimento de onda (λ) de 400-700 nm.



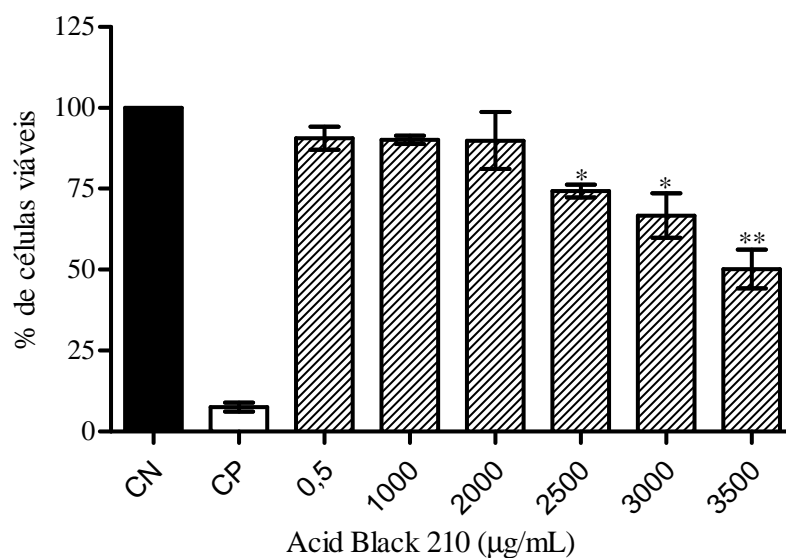
No entanto, durante a realização do ensaio de MTT utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210 comercial, foi observado que durante a etapa de lavagem das células com PBS, antes da adição da solução de MTT, todo o corante foi removido. Assim, foi possível a realização desse teste.

A Figura 12, mostra o resultado obtido no ensaio de MTT em células HepG2, utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210 em um tempo de exposição de 24 horas. Pode ser observado que dentre todas as concentrações avaliadas do corante Acid Black 210, a menor concentração que apresentou citotoxicidade foi a de 2500 $\mu\text{g/mL}$, inviabilizando aproximadamente 25 % das células.

Figura 12. Avaliação da citotoxicidade do corante Acid Black 210 comercial em células HepG2, através do ensaio de MTT. Tempo de exposição de 24 horas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três repetições. CN: Controle negativo (Culturas de células tratadas com meio DMEN contendo 10% de soro bovino fetal). CP: Controle positivo (Cultura de células tratadas com CCCP na concentração 10 μ M).

** Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).



4.2.2 Ensaio de micronúcleo em células HepG2 com o corante Acid Black 210

Foram realizadas diversas repetições do ensaio de micronúcleo utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210. No entanto, em todos os ensaios realizados, durante as análises das lâminas de micronúcleo no microscópio de fluorescência, observou-se um baixo número de células totais (mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas) (dados não mostrados) e um baixo número no total de células binucleadas presente nas lâminas, gerando dúvidas quanto a confiabilidade do teste.

Nos ensaios de micronúcleo são normalmente confeccionadas duas lâminas de micronúcleo para cada concentração testada. Em cada uma das duas lâminas são analisadas 1000 células binucleadas, obtendo-se assim 2000 células binucleadas por concentração testada. Como pode ser observado na Tabela 2, o número total de células binucleadas contadas nas lâminas de micronúcleo tratadas com diferentes concentrações do corante Acid Black 210 foi significativamente inferior ao número total de células binucleadas contadas nas lâminas do controle negativo. Nas lâminas dos controles negativos era possível ler 1000 células binucleadas com facilidade em cada uma das duas lâminas de cada concentração,

analisando apenas 50% delas. Já nas lâminas de micronúcleo referentes ao corante Acid Black 210, para todas as concentrações testadas, analisando 100% de duas lâminas de uma mesma concentração, obtinha-se uma quantidade inferior a 1000. Para as concentrações de 500 e 1000 µg/mL de Acid Black 210, a quantidade de células binucleadas obtidas na análise de 100% das duas lâminas foi inferior a 500 células binucleadas.

A diferença no número de células observadas nas lâminas do controle negativo e nas lâminas tratadas com diferentes concentrações do corante Acid Black 210 levou a suposição de que o corante testado, interfere no desenvolvimento do ensaio de micronúcleo provocando a perda das células durante o teste.

O ensaio de micronúcleo é um teste muito utilizado e bem estabelecido em nosso laboratório. Habitualmente, nos ensaios de micronúcleo realizados por nosso grupo de pesquisa, as lâminas de micronúcleo obtidas durante os ensaios apresentam uma grande quantidade de células binucleadas. Vale ressaltar que nos ensaios de micronúcleo realizados com o corante Disperse Red 73, durante a análise das lâminas, frequentemente era possível contar 2000 células binucleadas em uma única lâmina lendo aproximadamente 60 % dela. Assim, as diferenças observadas na comparação dos ensaios de micronúcleo do corante Acid Black 210, com os ensaios de micronúcleo realizados com o corante Diperse Red 73 e com outros ensaios de micronúcleo realizados por nosso grupo de pesquisa, reforçam à hipótese de que o corante Acid Black 210 poderia estar provocando algum efeito que contribuísse para perda das células durante o ensaio de micronúcleo.

A fim de explicar as observações realizadas durante a análise das lâminas de micronúcleo, foram incluídos no projeto os ensaios de proliferação celular, avaliação da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo e avaliação da atividade necrótica e apoptótica por citometria de fluxo.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos resultados obtidos em três repetições no teste de micronúcleo realizados em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Acid Black 210. % BN: Porcentagem de células binucleadas. MN: Número total de micronúcleo, IPBC: Índice de proliferação do bloqueio da citocinese.

Tratamentos	Número total de células binucleadas (média ± DP)	% BN (média ± DP)	MN (média ± DP)	IPBC (média ± DP)
MMS	2002 ± 2,6	34,20 ± 9,04	105,5 ± 31,3*	1,40 ± 0,13
Controle negativo	2005 ± 8,7	33,26 ± 3,60	34,5 ± 13,3	1,43 ± 0,17
0,05 µg/mL	1015 ± 24,3	35,42 ± 4,57	54,7 ± 27,6	1,38 ± 0,11
0,1	940 ± 8,5	37,34 ± 2,59	35,0 ± 19,8	1,32 ± 0,05
1	860 ± 7,1	32,12 ± 4,08	36,5 ± 30,4	1,31 ± 0,01
10	980 ± 2,6	40,17 ± 6,09	39,7 ± 18,2	1,43 ± 0,09
100	840 ± 228,4	38,30 ± 15,27	37,5 ± 22,9	1,45 ± 0,18
500	320 ± 254,6	38,40 ± 5,23	23,3 ± 29,3	1,42 ± 0,07
1000	450 ± 34,2	19,21 ± 3,98*	14,3 ± 19,7	1,21 ± 0,04

*Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,0001$)

A Tabela 2, também apresenta a porcentagem de células binucleadas, o número de micronúcleos obtidos e o IPBC obtidos para cada concentração testada. Pode-se observar que a porcentagem de células binucleadas obtidas foi superior a 35 % para todas as concentrações testadas, com exceção da concentração de 1000 µg/mL de Acid Black 210, em que a porcentagem de células binucleadas foi de 19,21 %. O número total de micronúcleos e o IPBC referente às concentrações de Acid Black 210 testadas, não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

4.2.3 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico sulforodamina B

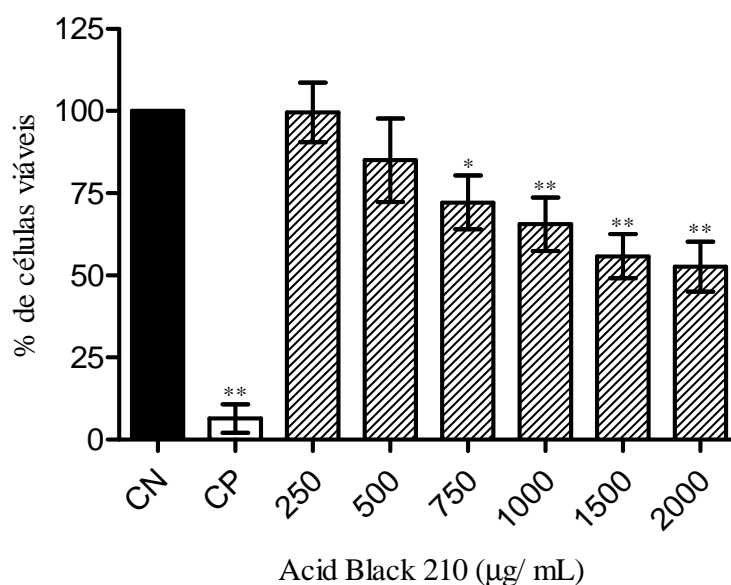
A proliferação e viabilidade celular das células HepG2 expostas à diferentes concentrações do corante Acid Black 210 foi avaliada através do ensaio colorimétrico sulforodamina B.

Como pode ser observado na Figura 13, nas concentrações de 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL ocorreu uma diminuição da viabilidade/proliferação celular, sendo que essa resposta foi dependente do aumento da concentração. A diminuição da viabilidade/proliferação celular é um indicativo de que o corante Acid Black 210 apresentou efeito citotóxico ou citostático.

Figura 13. Avaliação da proliferação através do ensaio colorimétrico sulforodamina B em células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do corante Acid Black 210. Tempo de exposição de 24 horas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três repetições. CN: Controle negativo (Culturas de células tratadas com meio DMEN contendo 10% de soro bovino fetal). CP: Controle positivo (Cultura de células tratadas t-butil hidroperóxido 100 μ M).

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

** Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).



4.2.4 Avaliação do tipo de morte celular em células HepG2

A indução da morte celular em células HepG2 expostas à diferentes concentrações do corante Acid Black 210 foi avaliada utilizando o ensaio de Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) por citometria de fluxo. Como pode ser observada na Figura 14 e na Tabela 3, não ocorreu variações estatisticamente significativas nas populações de célula expostas ao corante Acid Black 210 quando comparadas com o controle negativo.

Figura 14. Caracterização do tipo de morte celular induzida pelo tratamento das células HepG2 utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210. Os resultados estão expressos a partir da média e desvio padrão de três experimentos independentes.

*Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

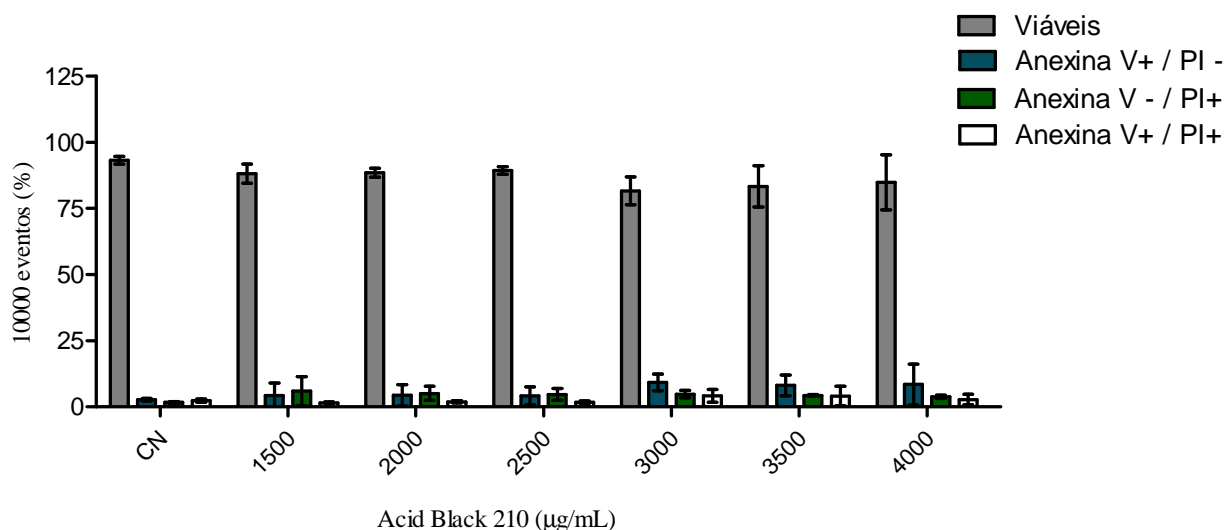


Tabela 3. Caracterização do tipo de morte celular induzida pelo tratamento das células HepG2 utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210. Os resultados expressam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado a cisplatina na concentração de 48 µg/mL.

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

** Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).

Tratamentos µg/mL	Viáveis (% média ± DP)	Anexina V + /PI- (Apoptose) (% média ± DP)	Anexina V - /PI + (Necrose) (% média ± DP)	Anexina V + /PI + (Apoptose/Necrose) (% média ± DP)
CN	93,25 ± 1,46	2,71 ± 0,51	1,68 ± 0,37	2,4 ± 0,63
CP	11,54 ± 2,48**	10,26 ± 0,46	13,28 ± 5,62*	64,9 ± 6,02**
1500	88,16 ± 3,63	4,33 ± 4,68	5,94 ± 5,51	1,6 ± 0,35
2000	88,53 ± 1,68	4,42 ± 4,01	5,10 ± 2,70	1,9 ± 0,38
2500	89,38 ± 1,45	4,18 ± 3,42	4,67 ± 2,24	1,8 ± 0,53
3000	81,66 ± 5,24	9,27 ± 3,22	4,89 ± 1,44	4,2 ± 2,39
3500	83,41 ± 7,80	8,13 ± 3,92	4,33 ± 0,32	4,1 ± 3,63
4000	84,95 ± 10,39	8,45 ± 7,75*	3,78 ± 0,64	2,8 ± 1,96

4.2.5 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

A distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular de células HepG2 expostas a diferentes concentrações do corante Acid Black 210 estão representadas na Figura 15 e na Tabela 4. Os resultados mostram que o corante Acid Black 210 nas concentrações de 1000 e 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziu um aumento estatisticamente significativo da população de células na fase G1/G0 com relação ao controle negativo e induziu uma diminuição estatisticamente significativa da população de células na fase S do ciclo celular quando comparado ao controle negativo.

Figura 15. Progressão do ciclo celular em células HepG2 expostas a diferentes concentrações do corante Acid Black 210 em um tempo de exposição de 24 horas. As células foram marcadas com IP (Iodeto de Propídeo) e o conteúdo do DNA foi analisado por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).

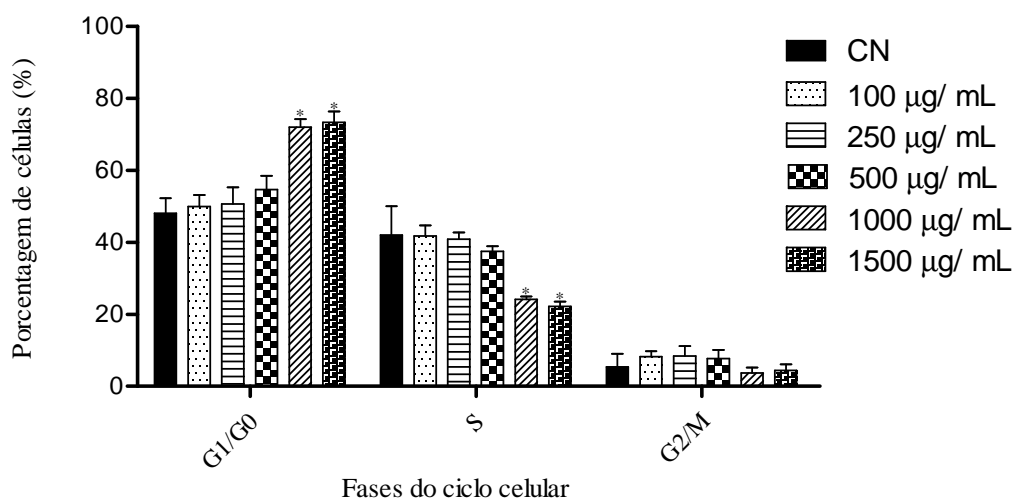


Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações do corante Acid Black 210 na progressão do ciclo celular em células HepG2, incubadas com o corante por 24 horas. As células foram marcadas com PI (Iodeto de Propídeo) e o conteúdo do DNA foram analisados por citometria de fluxo. Como controle positivo foi utilizado a cisplatina na concentração de 12 μ g/mL. Os resultados expressam a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,01$).

** Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).

Tratamentos μ g/mL	% G1/G0 (média \pm DP)	% S (média \pm DP)	% G2/M (média \pm DP)
CN	48,09 \pm 7,3	42,06 \pm 13,8	5,5 \pm 6,14
CP	66,42 \pm 7,15**	26,94 \pm 1,40 *	10,66 \pm 3,05
100	49,94 \pm 5,4	41,80 \pm 5,05	8,25 \pm 2,70
250	50,69 \pm 8,0	40,89 \pm 3,26	8,42 \pm 4,80
500	54,7 \pm 6,4	37,53 \pm 2,41	7,73 \pm 4,13
1000	72,06 \pm 3,8**	24,20 \pm 1,34**	3,73 \pm 2,60
1500	73,33 \pm 5,25**	22,22 \pm 2,36**	4,45 \pm 2,95

4.2.6 Ensaio de ecotoxicidade

O teste de sensibilidade dos organismos da espécie *Daphnia similis* deve ser realizado mensalmente para a avaliação da qualidade dos ensaios, validação dos resultados e composição da carta controle. Os ensaios agudos para avaliação da toxicidade do corante Acid Black 210 foram realizados no período de dois meses e, portanto foram feitos dois testes de sensibilidade com os organismos *Daphnia similis*. O teste de sensibilidade realizado no primeiro mês apresentou como resultado uma CE_{50} (concentração do sal que causou a imobilidade de 50% dos organismos) de 799,54 mg/L e no segundo mês obteve-se como resultado uma CE_{50} 714,78 mg/L. Esses valores estão dentro do intervalo de ± 2 unidade de desvios-padrão em relação aos valores médios da carta controle obtidos pela CETESB nos meses anteriores (dados não mostrados) e portanto estão dentro da faixa de aceitação para a realização dos ensaios com o corante.

Para o teste agudo em organismos *Daphnia similis*, utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210, foi primeiramente realizado um ensaio preliminar para a determinação do intervalo de concentração do Acid Black 210 que causa imobilidade das *Daphnia similis*. A OECD guideline 202 (2004) sugere que a concentração máxima utilizada nos ensaios de toxicidade aguda seja de 100 mg/L. Por isso, essa concentração foi definida como a concentração máxima para a realização do ensaio preliminar. Os valores de pH e oxigênio dissolvido foram monitorados durante

o início e final do teste agudo preliminar e estavam dentro dos valores estabelecidos pelas norma técnica ABNT NBR12713:2009 (valores não mostrados).

As Tabelas 5 e 6 apresentam a porcentagem de imobilidade dos organismos *Daphnia similis* em um tempo de exposição de 24 e 48 horas respectivamente.

Tabela 5. Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Acid Black 210 por 24 horas sem iluminação e alimento.

Acid Black 210	Número de organismos imóveis				Imobilidade	
	Réplicas				Total	Porcentagem (%)
Concentração mg/L	1	2	3	4	Total	Porcentagem (%)
Controle (0)	0	0	0	0	0/20	0
0,1	0	0	0	0	0/20	0
1,0	0	0	0	0	0/20	0
10	0	0	0	0	0/20	0
50	0	0	0	0	0/20	0
75	0	0	1	0	1/20	5
100	0	0	0	0	0/20	0

Tabela 6. Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Acid Black 210 por 48 horas sem iluminação e alimento.

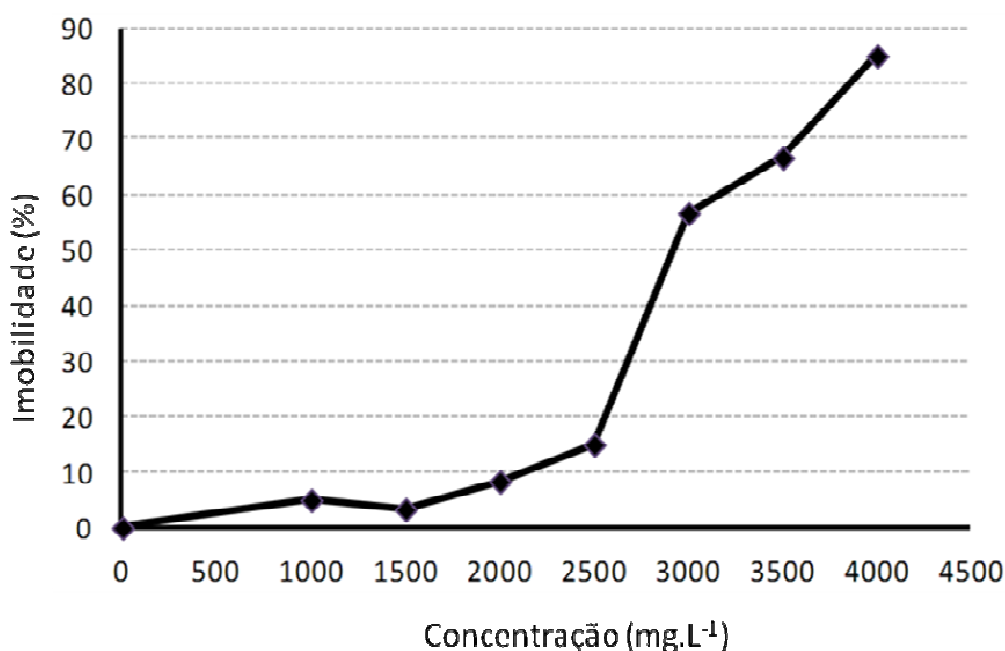
Acid Black 210	Número de organismos imóveis				Imobilidade	
	Réplicas				Total	Porcentagem (%)
Concentração mg/L	1	2	3	4	Total	Porcentagem (%)
Controle (0)	0	0	0	0	0/20	0
0,1	0	0	0	0	0/20	0
1,0	0	0	0	1	1/20	5
10	0	0	0	0	0/20	0
50	0	0	0	0	0/20	0
75	2	0	1	0	3/20	15
100	1	2	1	1	5/20	25

Como pode ser observado na Tabela 5, não ocorreu imobilidade de *Daphnia similis* nos ensaios com 24 horas de exposição para todas as concentrações de Acid Black 210 testadas, com exceção da concentração de 75 mg/L que provocou 5 % de imobilidade.

Na Tabela 6, pode-se observar que, para o teste agudo com 48 horas de exposição, as concentrações de 75 mg/L e 100 mg/L, causaram 15 e 25 % de imobilidade, respectivamente.

Com o objetivo de realizar uma avaliação mais detalhada, possibilitando o cálculo do CE_{50} pelo programa estatístico Trimed, foram realizados novos ensaios, onde foi testado o corante Acid Black 210 em concentrações superiores a 100 mg/L (Figura 16).

Figura 16. Imobilidade das *Daphnias similis* expostas a diferentes concentrações do corante Acid Black 210, por um período de 48 horas sem iluminação e alimento



Os resultados mostram que a concentração efetiva média (CE_{50}) é de 2993,73 mg.L⁻¹. Desse modo o corante Acid Black 210 tem uma baixa toxicidade e por ter um CE_{50} maior que 100 mg.L⁻¹ pode ser considerado como “praticamente não tóxico” segundo a classificação de Zucker (1985).

5 DISCUSSÃO

Durante o último século, a industrialização e o consumismo crescente resultaram na degradação de diversos ecossistemas, gerando um grande impacto ambiental e prejuízos à saúde humana. No caso de oceanos e rios, essa poluição é principalmente causada pela descarga de águas residuais industriais inadequadamente tratadas (ZANONI et al., 2014). Dentro desse contexto, as indústrias têxteis e de curtume se destacam, uma vez que os corantes utilizados em seus processos são importantes fontes de contaminação ambiental. Diversos estudos, tem demonstrado a presença desses corantes em águas superficiais e em águas para consumo humano, como relatados nos estudos de Carneiro et al. (2010), Umbuzeiro et al. (2005) e Oliveira (2010). Para os ecossistemas aquáticos, a presença dos corantes podem provocar a diminuição da penetração da luz e diminuição da solubilidade dos gases (ZHANG et al., 2012) e podem ser tóxicos ou mutagênicos para os organismos aquáticos gerando sérios prejuízos para o ecossistema (KUNZ et al., 2002). Já para os seres humanos, os corantes podem ser ingeridos através da água e alimentos contaminados, ou podem penetrar na pele através do contato dérmico. Alguns corantes após serem metabolizados pelas azoreductases da microflora intestinal ou por bactérias da pele geram aminas aromáticas capazes de induzir danos no material genético (UMBUZEIRO et al., 2005; BAFANA; DEV; CHAKRABART, 2011).

O ensaio de micronúcleo avalia mutações cromossômicas, sendo amplamente utilizado nos dias atuais para a biomonitorização humana (FENECH ET AL., 2007). Diversos estudos tem demonstrado uma correlação positiva entre a formação de micronúcleo e o surgimento de tumores, sendo portando, um ensaio importante a ser realizado na etapa de identificação do perigo durante a avaliação de risco. Desse modo, esse ensaio foi empregado para avaliar o potencial mutagênico dos corantes Acid Black 210 e Disperse Red 73 em células HepG2.

O ensaio de micronúcleo é uma técnica frequentemente utilizada e bem estabelecida em nosso laboratório. Nesse projeto foi realizada a padronização da coloração das lâminas de micronúcleo utilizando o corante alaranjado de acridina, a fim de se realizar um aperfeiçoamento no protocolo do ensaio.

O nosso grupo de pesquisa utilizava a coloração por Giemsa nos ensaios de micronúcleo. No entanto, diversos estudos publicados na literatura têm utilizado o alaranjado de acridina, principalmente porque possui algumas vantagens em relação à coloração com Giemsa, que cora em azul não somente os micronúcleos como também algumas inclusões celulares contendo RNA ou materiais ácidos (tais como grânulos de proteína), gerando dessa

forma diversos artefatos (HAYASHI et al, 1983; HEDDLE, et al, 2011; RIGLER, 1969). Desse modo, a coloração com Giemsa pode gerar resultados falsos positivos, como observado por Polard et al. (2011) que obtiveram maior frequência de MN com a coloração por Giemsa em comparação com o alaranjado de acridina, nas mesmas condições.

O alaranjado de acridina cora o DNA em verde amarelado e o RNA e polissacarídeos ácidos em vermelho, facilitando dessa forma a visualização dos micronúcleos e diminuindo os erros de contagem associados a utilização de corantes não específico para o DNA pela presença de artefatos (HEDDLE et al., 2011).

Diversos estudos foram publicados utilizando o corante alaranjado de acridina em ensaios de micronúcleo em células HepG2, com diferentes concentrações e tempos para a coloração: 0,0125 % (12,5 µg/mL) durante 15 s (UNGER; MELZIG, 2012), 0,01 % (10 µg/mL) durante 5 min (MARCARINE, et. al., 2009) e 40 µg/mL (HASHIZUME, et al., 2010). No entanto, seguindo esses parâmetros não obtivemos resultados satisfatórios. De acordo com nossos resultados, a melhor condição de coloração foi a utilização de uma solução de alaranjado de acridina 10 µg/mL, no tempo de 1 minuto e, portanto esses parâmetros foram utilizados nos ensaios subsequentes.

Os ensaios de micronúcleo realizados com o corante Disperse Red 73 indicaram que os valores do IPBC de todas as concentrações avaliadas desse corante não foram significativamente diferente ao IPBC do controle negativo, indicando que o Disperse Red 73 nas condições testadas não foi citostático e nem citotóxico para as células HepG2. Os resultados obtidos com os ensaios de micronúcleos também demonstraram que o corante Disperse Red 73, não provocou um aumento, estatisticamente significativo, no número total de micronúcleos em relação ao controle negativo, indicando assim que esse corante não induziu efeitos aneugênicos e clastogênicos no sistema celular avaliado, nas condições testadas. No entanto, o nosso grupo de pesquisa também realizou ensaios para avaliação do potencial mutagênico do corante Disperse Red 73, utilizando *Salmonella typhimurium*, utilizando as linhagens TA 98 e TA 100. Seguindo a classificação de mutagenicidade proposta por Claxton et al. (1991), o corante Disperse Red 73 induziu à mutagenicidade moderada na ausência de metabolização e mutagenicidade baixa na presença de metabolização exógena (S9), tanto por deslocamento do quadro de leitura (linhagem TA 98) quanto substituição de pares de base (linhagem TA 100). Essa diminuição da atividade mutagênica do corante Disperse Red 73, na presença de ativação metabólica é um indicativo de que os produtos gerados após a metabolização do corante pelas isoformas do citocromo P450 foram menos reativos com o DNA do que o corante Disperse Red 73 não metabolizado.

A diferença de resposta observada para o corante Disperse Red 73 nos ensaios de micronúcleo aqui apresentado e nos ensaios utilizando *Salmonella typhimurium*, ocorreu porque esses ensaios avaliam a mutagenicidade por mecanismos diferentes. Enquanto o ensaio de micronúcleo avalia a mutação cromossômica, o ensaio empregando *Salmonella typhimurium* avalia as mutações gênicas. Desta forma, podemos concluir que os principais mecanismos de ação mutagênica do Disperse Red 73 são o deslocamento de quadro de leitura e substituição de pares de bases. Nosso grupo de pesquisa realizou também o teste agudo utilizando o microcrustáceo *Daphnia similis* e de acordo com os resultados desse ensaio, o corante Disperse Red 73 foi classificado como extremamente tóxico, utilizando a escala de Zucker apresentando uma CI < 0,1 mg.L⁻¹. Assim, o conjunto de todos os ensaios realizados em nosso laboratório indica que o corante Disperse Red 73 provoca efeitos mutagênicos e toxicológicos em baixas concentrações, e esses resultados auxiliarão na identificação do risco de exposição ao corante Disperse Red 73.

Um dos objetivos do projeto inicial era o de realizar o ensaio de micronúcleo em células HepG2 utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210 a fim de se avaliar o potencial mutagênico desse corante. Para tanto, foram realizadas diversas repetições do ensaio de micronúcleo para a avaliação do potencial mutagênico do corante Acid Black 210. No entanto, em todos os ensaios realizados observou-se um baixo número de células totais (mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas), bem como um baixo número de células binucleadas, gerando dúvida quanto à confiabilidade dos resultados, o que dificultava muito ou impossibilitava a contagem de 2000 células binucleadas.

Desse modo surgiram duas hipóteses para tentar explicar esse fato: Poderia estar ocorrendo uma perda das células durante o ensaio, em decorrência de algum erro experimental ou então, o corante Acid Black 210, poderia estar induzindo a morte celular ou a parada no ciclo celular, com uma consequente diminuição do número de células nas lâminas de micronúcleo. Assim, para testar a primeira hipótese, foram realizadas diversas repetições do ensaio de micronúcleo utilizando o corante Acid Black 210, nos quais o protocolo experimental foi rigorosamente seguido e todos os resultados obtidos foram similares aos resultados anteriores. Além disso, foram realizados alguns ensaios onde o corante Acid Black 210 e o corante Disperse Red 73 foram testados concomitantemente. As lâminas tratadas com o corante Disperse Red 73, seguiram o padrão frequentemente observado nos ensaios de micronúcleo realizados em nosso laboratório, descartando assim os possíveis erros técnicos.

A hipótese de que o corante Acid Black 210 poderia estar causando uma parada no ciclo celular ou a morte das células foi então avaliada. No entanto, os valores do IPBC (índice

de proliferação celular) apresentados na Tabela 2, pareciam contrariar essa hipótese, uma vez que os valores do IPBC referentes ao Acid Black 210 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com relação ao valor do IPBC do controle negativo, indicando que não estava ocorrendo atividade citostática ou citotóxica nas culturas de células expostas às diferentes concentrações do corante Acid Black 210. O IPBC é um valor calculado com base na proporção do número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas encontradas no total de 500 células contadas por tratamento (OECD, 2014), sendo um indicador de efeito citostático e citotóxico. Esse índice não foi capaz de detectar a baixa quantidade de células nas lâminas de micronúcleo por dois motivos: Nos ensaios de micronúcleo realizados com o corante Acid Black 210, apesar da baixa quantidade de célula, foi possível contar o total de 500 células necessárias para o cálculo do IPBC e o número de células presente nas lâminas ainda mantinham a mesma relação de proporcionalidade entre as células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas quando comparadas ao controle negativo e por isso não ocorreu variações no valor do IPBC.

Os resultados obtidos com o ensaio de MTT também pareciam contrariar a hipótese de que o corante Acid Black 210 poderia estar causando uma parada no ciclo celular ou a morte das células, já que de acordo com esse ensaio a menor concentração citotóxica de Acid Black obtida foi de 2500 µg/mL. O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico que avalia a atividade mitocondrial, através da redução de um sal de tetrazólio (WANG et al., 2006). No entanto, diversos estudos tem demonstrado que alguns compostos químicos que possuem potencial redutor intrínseco, interferem no resultado do ensaio, uma vez que reagem com o sal de tetrazólio gerando um resultado de citotoxicidade impreciso (BRUGISSER et al., 2002; WANG et al., 2006; GANAPATHY-KANNIAPPAN et al., 2010; TONDER et al., 2015). Considerando que não há estudos sobre as propriedades químicas do corante Acid Black 210, o ensaio de MTT foi considerado como não conclusivo.

Assim para testar a hipótese de que o corante Acid Black 210 poderia estar provocando um efeito citotóxico ou citostático, foram adicionados ao projeto de pesquisa os ensaios de proliferação celular/citotoxicidade utilizando o método colorimétrico sulforodamina β, ensaio para avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo e ensaio para avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos pelo ensaio colorimétrico utilizando a sulforodamina β indicaram que na concentração de 750 µg/mL de Acid Black 210 ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular com relação ao controle negativo, sendo portando um indicativo que nas concentrações iguais ou superiores a 750 µg/mL, o corante

Acid Black 210 possui efeito citotóxico ou citostático em células HepG2. Esse resultado poderia explicar a baixa concentração de células nas lâminas de micronúcleo para a concentração de 1000 µg/mL do corante Acid Black 210, mas não poderia explicar os resultados obtidos para as menores concentrações testadas no ensaio de micronúcleo.

Os resultados obtidos com os ensaios de avaliação do tipo de morte celular demonstraram que o corante Acid Black 210 não induz morte celular por necrose ou apoptose em células HepG2, indicando que a diminuição da quantidade de células viáveis observada no ensaio de proliferação celular para as concentrações de 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL de Acid Black 210, não ocorreram em decorrência da morte celular e possivelmente ocorreram devido a inibição do ciclo celular.

De fato, os resultados obtidos através dos ensaios para a avaliação do ciclo celular indicaram que o corante Acid Black 210 nas concentrações de 1000 e 1500 µg/mL induziu um aumento estatisticamente significativo da população de células nas fases G1/G0 com relação ao controle negativo e induziu uma diminuição estatisticamente significativa da população de células na fase S. Esses resultados demonstram que o Acid Black nas concentrações de 1000 e 1500 µg/mL inibe o ciclo celular na fase G1/G0 e que a diminuição da população na fase S possivelmente ocorreu em consequência da parada do ciclo celular nas fases G1/G0. A parada no ciclo celular pode ocorrer na fase G1 quando as células ainda não passaram pelo ponto de restrição e em resposta à algum estímulo extracelular de estresse, o ciclo celular é interrompido e as células entram na fase G0 (MILAGROS; LAZAR, 2013; GELBERT et al., 2014) ou a parada no ciclo celular pode ocorrer no final da fase G1, quando erros são detectados pelo *checkpoint* G1/S e o ciclo é interrompido até que o problema seja solucionado (KONDRATOVA et al., 2015). Assim, os resultados indicam que as concentrações de 1000 e 1500 µg/mL do Acid Black 210 podem estar induzindo a passagem das células de G1 para G0, ou podem estar provocando algum erro no ciclo celular, ocasionando a parada do ciclo celular durante o *checkpoint* G1/S.

A presença de xenobióticos em sistemas biológicos pode ocasionar diferentes tipos de danos na célula. Assim sendo, foram realizados diferentes testes a fim de se explicar a baixa quantidade de células observadas nas lâminas de micronúcleo de culturas de células tratadas com o corante Acid Black 210. Os resultados obtidos com os ensaios de proliferação celular utilizando o método colorimétrico sulforodamina β, ensaio de avaliação do tipo de morte celular por análise por citometria de fluxo e avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo indicaram que as células HepG2 não sofrem morte celular ou parada no ciclo celular em baixas concentrações de Acid Black 210 (0,05, 0,1, 1, 10, 100 e 500 µg/mL) utilizadas nos

teste de micronúcleo e, portanto esses ensaios não explicam a baixa quantidade de células visualizadas nas lâminas de micronúcleo. Assim, com a análise conjunta de todos os ensaios realizados com o corante Acid Black 210 em células HepG2 levantamos a hipótese de que o corante atue diretamente na membrana celular das células HepG2, provocando um aumento da permeabilidade de membrana, sendo que essa alteração não é significativa o suficiente para ocasionar a morte celular, mas suficiente para deixar a célula mais sensível. Dessa forma, com as células HepG2 mais sensíveis é possível que ocorra uma perda de células durante a etapa da utilização do citrato de sódio no ensaio de micronúcleo. Essa etapa do ensaio de micronúcleo possui grande importância, uma vez que a utilização de soluções hipotônicas, como o citrato de sódio, permite que as células aumentem de volume possibilitando uma melhor visualização dos núcleos e micronúcleos.

Em condições fisiológicas normais, a membrana plasmática mantém a homeostase do meio intracelular, retendo o conteúdo citosólico e o gradiente iônico. Fatores físicos e químicos podem desestabilizar a membrana podendo ocasionar alterações na permeabilidade celular e na morfologia da membrana (LIU, 2002). Uma das consequências do aumento da permeabilidade de membrana plasmática é a perda de enzimas citosólicas e metabolitos, e alteração no gradiente eletroquímico que levam a morte celular. No entanto, alguns estudos mostram que o aumento da permeabilidade de membrana pode ser gradual, sem ocasionar a morte imediata da célula. Um estudo realizado por Chang (2001), mostra que células isoladas do túbulo proximal distal de coelhos que foram submetidas à anóxia, apresentaram 3 fases de permeabilidade de membrana. Na fase 1, a membrana plasmática tornou-se permeável ao PI (0,7 KDa). Na fase 2, as células tornaram-se permeáveis ao dextranos (3 KDa) e na fase 3 as células tornaram-se permeáveis aos dextranos de 70 KDa. Alterações progressivas na permeabilidade de membrana também foram observados em células renais de cães (DONG et al., 1998) e em células hepáticas (NISHIMURA; LEMASTERS, 2001). Dessa forma, o Acid Black 210 pode estar provocando pequenas alterações na permeabilidade da membrana das células HepG2 que não comprometem a viabilidade celular em condições normais, mas que deixam as células mais sensíveis. Assim a exposição dessas células, a outros fatores estressantes, como a presença do citrato de sódio, utilizado nas fases finais do ensaio de micronúcleo, pode ocasionar a morte celular e a consequente perda dessas células durante o procedimento experimental do teste de micronúcleo.

O ensaio para avaliação do efeito do Acid Black 210 na permeabilidade celular pode ser realizado através da análise em microscópio confocal das células expostas ao corante

estudado, avaliando a permeabilidade da membrana utilizando marcadores de tamanhos conhecidos tais como PI (iodeto de propídeo) e dextrans fluorescentes (CHANG, 2001).

Os testes de toxicidade aguda utilizando diferentes concentrações do corante Acid Black 210 foram realizados com o microcrustáceo *Daphnias similis* e foi obtido uma CE_{50} de 2993,73 mg/L. Assim o corante Acid Black 210 tem uma baixa toxicidade e por ter um CE_{50} maior que 100 mg/L pode ser considerado como “praticamente não tóxico” segundo a classificação de Zucker (1985).

Alguns estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, que foram desenvolvidos de forma concomitante com esse trabalho, demonstraram que o corante Acid Black 210 não possui potencial genotóxico quando avaliado pelo ensaio cometa em células HepG2 e que nos ensaios realizados com a *Salmonella typhimurium*, esse corante não induziu mutação por substituição de pares de bases (detectado pela linhagem TA 100) e apresentou um potencial mutagênico extremamente baixo em linhagens TA98 que detecta a mutação por deslocamento de quadro de leitura. Além disso, o corante Acid Black 210 não apresentou toxicidade para o zebrafish, em avaliações de alterações morfológicas. Desse modo, esses resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, juntamente com os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o corante Acid Black 210 possui baixa toxicidade e baixo potencial mutagênico nas condições testadas, fornecendo subsídios para que com outros estudos sejam realizados uma avaliação de risco.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O MTT não é uma metodologia eficiente para a avaliação da citotoxicidade do corante Disperse Red 73, porque o corante teste não é removido eficientemente durante as etapas de lavagem do ensaio de MTT e a leitura espectrofotométrica do ensaio é realizado no comprimento de onda que corresponde ao pico de maior absorção do corante.
- O corante Disperse Red 73 não foi capaz de induzir mutações cromossômicas nas células HepG2 em condições testadas.
- O corante Acid Black 210 somente leva à morte celular por apoptose em células HepG2 em altas concentrações (4000 µg/mL).
- O corante Acid Black 210 nas concentrações de 1000 e 1500 µg/mL provocaram a parada no ciclo celular na fase G1/G0 em células HepG2.
- Provavelmente a exposição ao corante Acid Black 210 ocasiona alterações na membrana celular em células HepG2 indicando que os ensaios de micronúcleo, talvez não sejam adequados para avaliar o efeito mutagênicos de compostos que provoquem alterações na permeabilidade da membrana.

Considerações finais

Os resultados obtidos nesse trabalho juntamente com outros resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (citados no item DISCUSSÃO) sugerem que o corante Acid Black 210 possui baixa toxicidade e mutagenicidade, visto que os efeitos desse corante são observados apenas em altas concentrações. Os resultados obtidos com o corante Disperse Red 73 pelo nosso grupo de pesquisa indicam que este composto apresenta grande relevância em toxicologia ambiental e humana, já que os efeitos tóxicos e mutagênicos desse corante ocorrem em baixas concentrações. No entanto, outros estudos deverão ser realizados com os corantes estudados para que seja realizada uma avaliação de risco para os seres humanos e para o meio ambiente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMA, D. M. M. *Daphnia Magna* as a Test animal in acute and chronic toxicity Test. **Hydrobiologia** vol . v. 59, n.2, p. 125-134, 1978.

ALMEIDA D, F; MARTINS, A. H; TUNDISI, J.G. Weight-of-evidence on environmental impact assessment of metal contaminated sediments in the São Francisco River (Três Marias - Minas Gerais - Brazil) - a case study. **Braz. J. Biol**, v. 71, n.4, p. 961-973, 2011.

ASHFAQ, A.; KHATOON, A. Waste Management of Textiles: A Solution to The Environmental Pollution. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 3n. 7, p. 780-787, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia Aquática- Toxicidade Aguda – Método de ensaio com *Daphnia ssp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009. 23p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 33733: Ecotoxicologia Aquática- Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia ssp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2010. 18p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). Disponível em: <http://www.abit.org.br/n/mg-recebe-evento-de-promocao-a-competitividade-e-internacionalizacao>. Acesso em: 30 de outubro de 2015.

BACCAR, R.; BLÁNQUEZ, P.; BOUZID, J.; FEKI, M.; ATTIYA, H.; SARRÀ, M. Decolorization of a tannery dye: From fungal screening to bioreactor application. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56. p. 184– 189, 2011.

BAE, J-S. ,FREEMAN, H. S. Aquatic toxicity evaluation of copper-complexed direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, v. 73, p. 126-132, 2007.

BAFANA, A.; DEV, S. S.; CHAKRABART, T. Azo dyes: past, present and the future; **Environ. Rev**, v. 19, p. 350–370, 2011.

BALLISTER, E. R.; RIEGMAN, M.; LAMPSON, M. A. Recruitment of Mad1 to metaphase kinetochores is sufficient to reactivate the mitotic checkpoint. **J. Cell Biol**, v. 204, n.6, p.901–908, 2014.

BENDRIS, N.; LEMMERS, B.; BLANCHARD, J. M.; ARSIC, N. Cyclin A2 Mutagenesis Analysis: A New Insight into CDK Activation and Cellular Localization Requirements. **PLoS ONE**, v.6, n.7, 2011.

BERLANGA, SOLANGE E DAVINO. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. Camargo, M. M. A.; Batistuzza, J. A. **Fundamentos de toxicologia**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201204_3.shtm. Acesso em: 08/02/2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONAMA 357/2005/RESOLUÇÃO N. 397/2008.

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.

BRUCE, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos de Biologia Celular**. Cap. 6- Replicação , Reparo e Recombinação do DNA. 3 ed. Artmed, 2011.

BRUGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med**, v. 68, n. 5, p. 445–8, 2002.

CANTER, L. W.; KNOX, R. C. Groundwater Pollution Control. In: Kirchhoff, D. **Avaliação do Risco Ambiental e o Processo de Licenciamento: O caso do Gasoduto de Distribuição de Gás Brasileiro Trecho São Carlos- Porto Ferreira**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos- Universidade de São Paulo, 2004.

CARDINALE, F.; BRUZZI, P.; BOLOGNESI C. Role of micronucleus test in predicting breast cancer susceptibility:a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v.106, p. 780-790, 2012.

CARNEIRO, P. A.; UMBUZEIRO, G. A.; OLIVEIRA, D. P.; ZANONI, M. V. B. Assessment of water contamination caused by a mutagenic têxtil effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. **Journal of Hazardous Materials**. v. 174. p. 694-699, 2010.

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

CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL (CICB). Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/site/content/noticias/?q=10293>. Acesso em: 02/02/2012.

CHANG, K. H.; SAKAMOTO, M.; HANAZATO, T. Impact of pesticide application on zooplankton communities with different densities of invertebrate predators: An experimental analysis using small-scale mesocosms. **Aquatic Toxicology**, v.72, p. 373–382, 2005.

CHAZIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A.. **Intoxicação e avaliação da toxicidade**. In: AZEVEDO, F. A. e CHASIN, A. A. M. As bases toxicológicas da Ecotoxicologia. São Carlos: RiMa. São Paulo: Intertox, 2003.

CHEQUER, F.M.D., DORTA, D. D.; OLIVEIRA, D. P. **Azo Dyes and Their Metabolites: Does the Discharge of the Azo Dye into Water Bodies Represent Human and Ecological Risks?**. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-treating-textile-effluent/azo-dyes-and-their-metabolites-does-the-discharge-of-the-azo-dye-into-water-bodies-represent-human-a>. Acesso em: 20/04/2014.

CHEQUER, F.M.D.; ANGELI, J.P.F.; FERRAZ, E.R.A.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; OIIVEIRA, 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**. v.676, p.83–86, 2009.

CHUNG, K. T, 2000. Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from Azo Dyes. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**. v. C18. n. 1. P. 51-74, 2000.

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

CIVELEKOGLU-SCHOLEY, G. ; CIMINI, D. Modelling chromosome dynamics in mitosis: a historical perspective on models of metaphase and anaphase in eukaryotic cells. **Interface focus**. n. 4, p.1-9, 2014.

CLAXTON , L. D; HOUK, V. S.; MONTEITH, L.G.; MYERS, L. E.; HUGHES, T. J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. Without exogenous activation. **Mutation Research**, v. 253, p. 137-147, 1991.

CORLU, A.; LOYER, P. Regulation of the G1/S Transition in Hepatocytes: Involvement of the Cyclin-Dependent Kinase Cdk1 in the DNA Replication. **International Journal of Hepatology**, p. 1-17, 2012.

CORRÊA, C. L; ALONZO, H. G.; TREVISAM R. M. S. Avaliação de Risco. In: OGA, S. Camargo, M. M. A.; Batistuzza, J. A. **Fundamentos de toxicologia**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

DOMINGUES, D. F; BERTOLETI, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2ª Ed. Editora Rima, São Carlos, 2008. Cap 7. P 167 a 169.

EASTMOND, D. A.; Hartwig, A.; Anderson, D.; Anwar, W. A.; Cimino, M. C.; Dobrev, I.; Douglas, G. R.; Nohmi, T.; Phillips, D. H.; Vickers, C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, v. 24, n. 4. p. 341-349, 2009.

ELING, T.; CURTIS, J.; BATTISTA, J.; MARNETT, L.J. Oxidation of (+)-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by mouse keratinocytes: evidence for peroxy radical- and monooxygenase-dependent metabolism. **Carcinogenesis**, v. 7, p.1957–1963, 1986.

ELKHOLI, R. KONSTANTINOS, V. F.; CHIPUK, J. E. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. **Genes & Cancer**, v. 2, n.5, p.523–537, 2011.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol**, v.35, n.4, p. 495–516, 2007.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.2 n.5, 2007.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1 p. 125–132, 2011.

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

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

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**, Amsterdam, v. 534, p. 65-75, 2003.

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

FERRAZ, E.R.A.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-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, 2010.

FORSS, J.; WELANDER, U. Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 227-237, 2011.

FOSTER, D. A.; YELLEN, P.; XU, L.; SAQCENA, M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). **Genes & Cancer**, v., n.11, p. 1124 –1131, 2010.

FREEMAN, H. S.; ESANCY, J. F.; CLAXTON, L. D. An approach to the design of nonmutagenic azo dyes: Analogs of the mutagen CI Disperse Black 17. **Dyes Pigments**. v. 13. p. 55–70, 1990.

FREITAS, E. C; ROCHA, O. Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran *Pseudosida ramosa*: The Importance of Using Native Species as Test Organisms. **Arch Environ Contam Toxicol**, v.60, p.241–249, 2011.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S.; GESCHWIND, J. F.; KUNJITHAPATHAM, R.; BUIJS, M.; SYED, L. H.; RAO, P. P.; OTA, S.; VALI, M. The Pyruvic Acid Analog 3-Bromopyruvate Interferes With the Tetrazolium Reagent MTS in the Evaluation of Cytotoxicity. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 8, n. 2, p. 258- 262, 2010.

GAURISANKAR, S.; TANYA, D. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. **Cell Division**, v. 3, n. 14, p. 1-14, 2008.

GEETHA, A.; PALANISAMY, N. Advanced Non-Conventional Activated Carbon and Sawdust Coated with Polymers for the remediation of Dye House Effluent. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 4, n. 9, p. 8335-8338, 2015.

GELBERT, L. M.; CAI, S.; LIN, X.; SANCHEZ-MARTINEZ, C.; DEL PRADO, M.; LALLENA, M. J.; TORRES, R.; AJAMIE, R. T.; WISHART, G.N.; FLACK, R.S.; NEUBAUER, B.L.; YOUNG, J.; CHAN, E.M.; IVERSEN, P.; CRONIER, D.; KREKLAU, E., DE DIOS, A. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. **Invest New Drugs**, v. 32, p. 825–837, 2014.

GLADDEN, A. B; DIEHL, J. A. Location, location, location :therole of cyclin D1 nuclear localization in cancer. **J Cell Biochem**, v. 96, p. 906–913, 2005.

GLOBALY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHEMICALS (GSH). **Part 4: Environmental Hazards**. Fifth revised editions. United Nations. New York and Geneva, p. 219-245, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/English/STSG-AC10-30-Rev5e.pdf. Acesso em: 20/02/2015.

GOTO, H.; INOKO, A.; INAGAKI, M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 70, p. 3893–3905, 2013.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUARANTINI, C. C. I.; ZANONI, M. M. V. B. Corantes Têsteis. **Química Nova**, v, 23, n.1, p. 71-78, 2000.

HAMILTON, M. A; RUSSO, R.C; THRSTON, R.V. Ttimmed Spearman-Karber method for stimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Enviromental Science and Technology**, v. 11, p. 714-719, 1997.

HANAZATO, T., HIROKAWA, H. Sensitivity of *Daphnia pulex* of different ages to the insecticide carbaryl. **Environ. Toxicol.** v. 4, p. 67–72, 2001.

HARRIS, C.A. et al. Principles of Sound Ecotoxicology. **Environ. Sci. Technol.**, v. 48, p. 3100–3111, 2014.

HASHIZUME, T. YOSHITOMI, S.; ASAHI, S.; MATSUMURA. S.; CHATANI, F.; ODA. H. In vitro micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. **Mutation Research**. v. 677. p. 1-7, 2009.

HAYASHI, M.; SOFUNI T.; ISHIDATE, M. JR. An application of Acridine Orange fluorescent stainingto the micronucleus test. **Mutation Research**. v. 120. p. 241-247, 1983.

HEDDLE, J. A. et al. Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 3–10, 2011.

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

IARMARCOVAI, G., BONASSI. A.; BOTTA. A. BAAN. R.A, ORSIE'RE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**,

v. 658, p. 215-233, 2008.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs- 100 F (2010)**. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-14.pdf>. Acesso em: 10/05/2014.

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

JAYAKIRAN, M. Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review. **J Clin Exp Pathol**, v. 5, n.1, 2015.

JHONSON, A.; SKOTHEIM, J. M. Start and the restriction point. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 6, p. 717- 723, 2013.

JINHUA, Z. et al. Measurement and Correlation of Solubilities of C.I. Disperse Red 73, C.I. Disperse Blue 183 and Their Mixture in Supercritical Carbon Dioxide. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 4, p. 648-653, 2010.

KAHRU, A.; IVASK, A. A. Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n.3, p. 823- 833, 2013.

KANG, S. H.; KWON, J. Y.; LEE, J. K.; SEO, Y. R. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. **Journal of Cancer Prevention**. v. 18, n. 4, 2013.

KANT, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural Science*, v. 4, n. 1, p. 22-26, 2012.

KAO, C. M.; CHOU, M.S.; FANG, W.L.; LIU, B. W.; HUANG, B. R. Regulating colored textile wastewater by 3/31 wavelength admittance methods in Taiwan. **Chemosphere**, v. 44, p. 1055-1063, 2001.

KEATING, K. I. A system of defined (*Sensu stricto*) media for daphnid (Cladocera) culture. **Water Research**, v. 19, p. 73-78, 1985.

KEIRA, S. M. Experimental model for fibroblast culture. **Acta Cir Bras** (serial online). Special Edition.v. 19. p. 11., 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v19s1/v19s1a03.pdf>. Acesso em: 22/03/2013.

KHAN, N.; LAWLOR, K. E.; MURPHY, J. M.; VINCE, J. E. More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling. **Current Opinion in Immunology**, v. 26 p.76-89, 2014.

KIM, H. E.; JIANG, X.; DU, F.; WANG, X. PHAPI, CAS, and Hsp70 Promote Apoptosome Formation by Preventing Apaf-1 Aggregation and Enhancing Nucleotide Exchange on Apaf-1. **Molecular Cell**, v. 30, n. 2, p.239–247, 2008.

KIRCHHOFF, D. **Avaliação do Risco Ambiental e o Processo de Licenciamento: O caso do Gasoduto de Distribuição de Gás Brasileiro Trecho São Carlos- Porto Ferreira**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos- Universidade de São Paulo, 2004.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFAL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, 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.

KOJIMA, M.; DEGAWA, M.; HASHIMOTO, Y.; TADA, M. Different effects of DNA adducts induced by carcinogenic and noncarcinogenic azo dyes on in vitro DNA synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 179, p. 817–823, 1991.

KOLLURU, R. V. **Environmental strategies handbook: a guide to effective policies and practices**. McGraw-Hill, New York, cap. 11, p. 327-432, 1994.

KONDRATOVA, A.; Watanabe, T.; Marotta, M.; Cannon, M.; Segall, A. M; Serre, D.; Tanaka, H. Replication fork integrity and intra-S phase checkpoint suppress gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 5, 2015.

KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T.A. TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations - **A review. Applied Catalysis B: Environmental**. v. 49, p.1–14, 2004.

KOTA, N. et al. Effect of feeding turmeric on benzo(a)pyrene induced dominant lethal mutations. **Journal of Genetics Study**, 2013.

KOUSHOLT, A. N.; MENZEL, T.; SØRENSEN, C. S. Pathways for Genome Integrity in G2 Phase of the Cell Cycle. *Biomolecules*, v.2, p. 579-607, 2012.

KRAUTWALD, S.; ZIEGLER, E.; RÖLVER, L.; LINKERMANN, A.; KEYSER, K. A.; STEEN, P.; WOLLERT, K. C.; KORF-KLINGEBIEL, M.; KUNZENDORF, U. Effective Blockage of Both the Extrinsic and Intrinsic Pathways of Apoptosis in Mice by TAT-crmA.

The Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 26, p. 19997–20005, 2010.

KUBERAN, T. et al. Biodegradation of Azo Dye by *Listeria Sp.* **International Journal of Environmental Science**, v.1, n. 7, 2011.

KUNZ, A.; ZAMORA-P. P.; MORAES, S.; DURÁN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. **Quimica Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LAJMANOVICH, R. C. et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research**, 2014.

LAMY, E. et al. Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erucolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2415–2421, 2008.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in genetics**, v. 4, n. 131, p. 1-17, 2013.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Bras.**, v. 3., n. 12, p. 355-381, 2008.

MALUMBRES, M. Physiological relevance of cell cycle kinases. **Physiol Rev**, v. 91 973–1007, 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. **Nature Review**, v. 1, p. 222- 231, 2001.

MANSOUR, H, B; AYED-AJMI, Y.; MOSRATI, R.; CORROLER, D.; GHEDIRA, K.; BARILLIER, D.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Acid violet 7 and its biodegradation products induce chromosome aberrations, lipid peroxidation, and cholinesterase inhibition in mouse bone marrow. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** v. 17, n. 7, p. 1371–1378, 2010.

MANSOUR, H.B., CORROLER, D., BARILLIER, D., GHEDIRA, K., CHEKIR, L., MOSRATI, R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effects 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, n. 9, p. 1670- 1677, 2007.

MANSOUR, H.B.; HOUAS, I.; MONTASSAR, F.; GHEDIRA, K.; BARILLIER, D.; MOSRATI, R.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Alteration of in vitro and acute in vivo toxicity of textile dyeing wastewater after chemical and biological remediation. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.19, n.7, p.2634-43, 2012.

MARCARINI, J. C.; TSUBOY, M. S. F.; LUIZ, R. C. RIBEIRO, L. R. HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MANTOVANI, M. S. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2010.

MATHIEU-DENONCOURT, J. et al. Sediment Contaminated with the Azo Dye Disperse Yellow 7 Alters Cellular Stress- and Androgen-Related Transcription in *Silurana tropicalis* Larvae. **Environ. Sci. Technol**, v. 48, p. 2952–2961, 2014.

MCCALL, K. Genetic control of necrosis-another type of programmed cell death. **Current Opinion in Cell Biology**, n. 22. p.882-888, 2010.

MCLLWAIN, D. R.; BERGER, T. MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 4, p. 1-28, 2013.

MEDVEDEV, Z. A.; CROWNE, H. M.; MEDVEDEVA, M. N. Age related variations of hepatocarcinogenic effect of azo dye (3'-MDAB) as linked to the level of hepatocyte polyploidization. **Mechanism of Ageing and Development**, v. 46, p. 159-174, 1988.

MENA, A. L.; LAM, E. W-F.; CHATTERJEE, S. Sustained Spindle-Assembly Checkpoint Response Requires De Novo Transcription and Translation of Cyclin B1. **PLoS ONE**, v.5, n.9, p. 1-9, 2010.

MENG, X.; LIU, G.; ZHOU, J.; SHIANG FU, Q.; WANG, G. Azo dye decolorization by *Shewanella aquimarina* under saline conditions. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 95–101, 2012.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. In: Oliveira, R. C. S. 2004. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2**. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Doutor em Ciências, 2012.

MEVORACH, D.; TRAHTEMBERG, U.; KRISPIN, A.; ATTALAH, M.; ZAZOUN, J.; TABIB, A.; GRAU, A.; VERBOVETSKI-REINER. What do we mean when we write "senescence", "apoptosis", "necrosis" or "clearance of dying cells"? **Ann. N. Y. Acad. Sci**, p. 1-9, 2010.

MOBAHAT, M.; NARENDRAN, A.; RIABOWOL, K. Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy. **Int. J. Mol. Sci**, v. 15, n. 2, p. 2494-2516, 2014.

MODI, H. A.; RAJPUT, G.; AMBASANA, C. Decolorization of water soluble azo dyes by bacterial cultures, isolated from dye house effluent. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6580–6583, 2010.

MOHAN, S. V.; RAO, N. C.; SARMA, P. N. Simulated acid azo dye (Acid black 210) wastewater treatment by periodic discontinuous batch mode operation under anoxic-aerobic-anoxic microenvironment conditions. **Ecological Engineering**, v. 31. p. 242–250, 2007.

MOLDOVEANU, A. M. Preliminary studies regarding cell density and temporal dynamics of bacterial biofilms formed at liquid-sediment interface using bright field and epifluorescence microscopy. **Biologie**, v. 19, p. 75-81, 2010.

MORGAN, D.; DESAI, A.; EDGAR, B.; GLOTZER, M. HEALD, R.; KARSENTI, E.; NASMYTH, K.; PINES, K.; SHERR. Cap. 17: Ciclo Celular. In: ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K. **Biologia Molecular da Célula**. 5rd ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 17, p. 1054- 1101, 2010.

NARDOCCI, A. C. **Avaliação Probabilística de riscos de exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) para a população da cidade de São Paulo**. (Dissertação). Concurso de Livre Docência. Departamento de Saúde ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2010.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagen/carcinogens. **Mutagenesis**. v. 6. p. 399-403, 1991.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, 2013.

NORBERG-KING, T.J. **A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach**. Version 2.0 (software). US.EPA-Duluth, Minnesota, 1993.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for the Testing of Chemicals. n. 487, 2010.

OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CHEQUER, F. M. D.; GRANDO, M. D.; ANGELI, J. P. F.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; OSUGI, M. E.; LIZIER T. M.; ZANONI, M. V.; OLIVEIRA DP. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange. **Mutation Research**, v. 703, p. 200-208, 2010.

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

OLIVEIRA, G.A.R., FERRAZ, E.R.A., CHEQUER, F.M.D., GRANDO, M.D., ANGELI, J.P.F., TSUBOY, M.S., MARCARINI, J.C., MANTOVANI, M.S., OSUGI, M.E., LIZIER, T.M., ZANONI, M.V.B, OLIVEIRA, D.P. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. **Mutation Research**, v.703, p.200–208, 2010.

OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A; CASTRO, F.J.V.; ZANONI, M.V.B. Photoelectrocatalytic oxidation of remazol turquoise blue and toxicological assessment of its oxidation products. **Journal of Hazardous Materials B**, v.137, 871–877, 2006.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **Bacterial decolorization and degradation of azo dyes**, v. 59, p. 73-84, 2007.

PEARCE, C.I.; LLOYD, J.T.; GUTHRIE, J. T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, v. 58, p. 179-196, 2003.

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.

PICCIN, J. S.; GOMES, C.S.; FERIS, L.A.; GUTTERRES, M. Kinetics and isotherms of leather dye adsorption by tannery solid waste. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 30–38, 2012.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181- 182, p. 475-481, 2002.

PLAA, G. L. Present status: toxic substance in the environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 1010-1016, 1982.

POLARD, T. et al. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 144–149, 2011.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 281, p. 301-311, 2004.

PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell Cycle and Apoptosis. **Neoplasia**, v. 2, n. 4, p. 291- 299, 2000.

RAJKUMAR, D.; SONG, B.J.; KIM, J.G. Eletrochemical degradation of reactive blue 19 in chloride medium for the treatment of textile dyeing wastewater with identification of intermediate compounds. **Dye and Pigments**, v. 72, p. 1-7, 2007.

RATNA; PADHI, B.S. Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation. **International Journal of Environmental Sciences**, v.3, n.3, 2012.

RIGLER, R. Acridine Orange in nucleic acid analysis. **Acad. Sci**, v.157, p. 211-224.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with 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 in vitro. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas:Ulbra, 2003. Cap 8. p.201-223.

SANT'ANNA, J. R.; FRANCO, C. S. C. C.; CASTRO-PRADO, M. A. A. Assessment of In Vivo and In Vitro Genotoxicity of Glibenclamide in Eukaryotic Cells. **PLOS ONE**, v. 13, n.3, p. 1-13, 2015.

SANTOS, A. M. M. M., CORREA. A.R.; ALEXIM, F.M.B.; PEIXOTO, G. B.T. Panorama do Setor do couro no Brasil. Informe Setorial, set. 2001. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set1603.pdf. Acesso em: 21/02/2012.

SARATALE, R.G.; SARATELE, G.D.; CHANG. J.S.; GOVINDWAR, SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 138-157, 2011.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SEKAR, S. et al. Choline-Based Ionic Liquids-Enhanced Biodegradation of Azo Dyes. **Environ. Sci. Technol**, v. 46, p. 4902–4908, 2012.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**. v.22, p. 1117-119, 1991.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assesment of growth characteristics. IC-50-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlin, v.33, n.11, p. 813-823, 1995.

SILVA, M. T. Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program.

Febs Letters, v. 584, n. 22, p. 4491- 4499, 2010.

SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E.; SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p. 1073-1078, 2007.

STAHLMANN, R. et al.; Sensitizing potential of four textile dyes and some of their metabolites in a modified local lymph node assay. **Toxicology**. v. 219. p. 113-123, 2006.

STIBOROVÁ, M. et al. Induced Expression of Cytochrome P450 1A and NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Determined at mRNA, Protein, and Enzyme Activity Levels in Rats Exposed to the Carcinogenic Azo Dye 1-Phenylazo-2-naphthol (Sudan I). **Chem. Res. Toxicol**, v. 26. P. 290-299, 2013.

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

TATARAZAKO, N.; ODA, S. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. **Ecotoxicology**, v. 16, p.197–203, 2007.

TENGA, M. J.; LAZAR, I. M. A Proteomic Snapshot of Breast Cancer Cell Cycle: The G1/S Transition Point. **Proteomics**, v.13, n. 1, p. 48–60, 2013.

TENNANT, J. R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. **The Official Journal of Transplantation Society**, v. 2, n. 6, p. 685. 1964.

THORNBERRY, N., AND LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 28, n. 281, p. 1312–1316, 1998.

TONDER, A. V.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 47 p. 2-10, 2015.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F; MANTOVANI, M.S.; KNASMULLER, 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.

TZIFI, F.; ECONOMOPOULOU, C.; GOURGIOTIS, D.; ARDAVANIS, A.;

PAPAGEORGIOU, S.; SCORILAS, A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. **Advances in Hematology**, p. 1- 15, 2012.

UMBUNZEIRO, G. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; DE 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.; 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.

UNGER, P.; MELZIG, M. F. Comparative Study of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Alpha- and Beta-Asarone. **Scientia Pharmaceutica**. v. 80. p. 663-668, 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), 2015. Disponível em: <http://www2.epa.gov/risk>. Acesso em: 28/05/2015.

VACCHI, F. I. et al. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 302–309, 2013.

VAN LEEUWEN, D. M. PEDERSEN, M.; KNUDSEN, L. E.; BONASSI, S.; FENECH, M.; KLEINJANS, J. C. S.; JENNEN, D. G. J. Transcriptomic network analysis of micronuclei-related genes: a case study. **Mutagenesis**, v. 26, n.1, p. 27-32, 2011.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; BERGHE, T.V.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 700-714, 2010.

VERMA, Y. Acute toxicity assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using *Daphnia magna* bioassay. **Toxicology and Industrial Health**, v.24. p. 491–500, 2008.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. Regulation The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif**, v. 36, p.131–149, 2003.

VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. **Mutagenesis**. v. 26, n. 1, p. 11–17, 2011.

WANG, X.; GE, J.; WANG, K.; QIAN, J.; ZOU, Y. Evaluation of MTT assay for measurement of emodin-induced cytotoxicity. **Assay Drug Dev Technol**, v. 4, n. 2, p. 203–207, 2006.

WANG, Y. et al. Experimental and theoretical studies on the photoinduced acute toxicity of a series of anthraquinone derivatives towards the water flea (*Daphnia magna*). **Dyes and Pigments**, v. 83, p. 276–280, 2009.

WASSON, G. R.; MCKELVEY- MARTIN, V. J.; DOWNES, C. S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v. 33, n. 3, p. 153-162, 2008.

WEST, INC; GULLEY, D. **TOXATAT 3.5**. University of Wyoming, 1996.

ZAHRIM, 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 Hazardous Materials**, v. 182, p. 624–630, 2010.

ZANELLA, G.; SCHARF, M.; VIEIRA, G.A.; PERALTA-ZAMORA, P. Tratamento de Banhos de Tingimento Têxtil por Processo Foto-Fenton e Avaliação da Potencialidade de Reuso. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1039-1043, 2010.

ZENG, W.; WANG, X.; XU, P.; LIU, G.; EDEN, H. S.; CHEN, X. Molecular Imaging of Apoptosis: From Micro to Macro. **Theranostics**, v. 5, n. 6, p.559-582, 2015.

ZHANG, W. et al. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 11, p. 2019–2027, 2012.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **News Physiol Sci**, v. 19, p.124-128, 2004.

ZOLLINGER, H. **Color Chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments**. New York: ed. Zurich, 2003.