

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 doxorrubicina	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 doxorrubicina 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 doxorrubicina 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-butil 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 Ensaios 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 Ensaios 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).

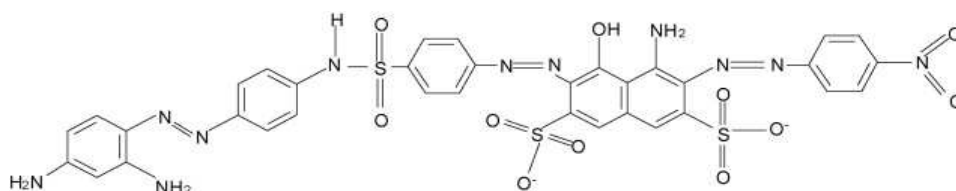
Devido à sua estabilidade, os corantes azo não são totalmente degradados por processos convencionais de tratamento de águas residuais que envolvem a utilização de luz, produtos químicos ou lodos ativados e, portanto, são liberados para o meio ambiente (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; KONSTANTINOPOULOS, 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.

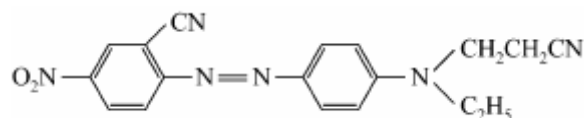
Figura 1. Estrutura química do corante Acid Black 210 (FONTE: ZHRIM; TIZAOUI; HILAL., 2010).



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.

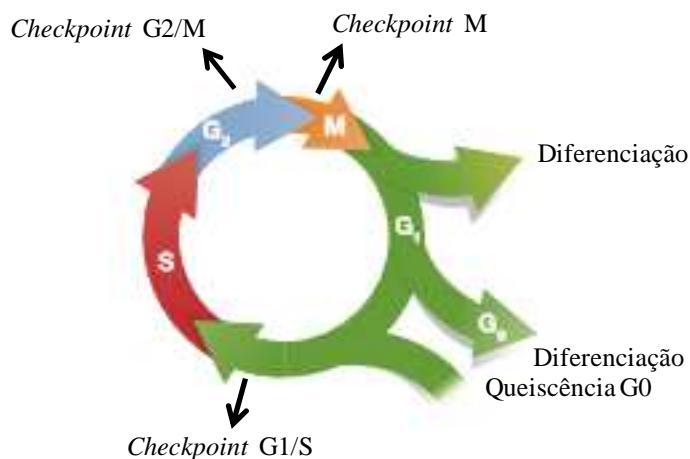
1.4 Ensaios ecogenotóxicológicos

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; CIVELEKOGLU-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).

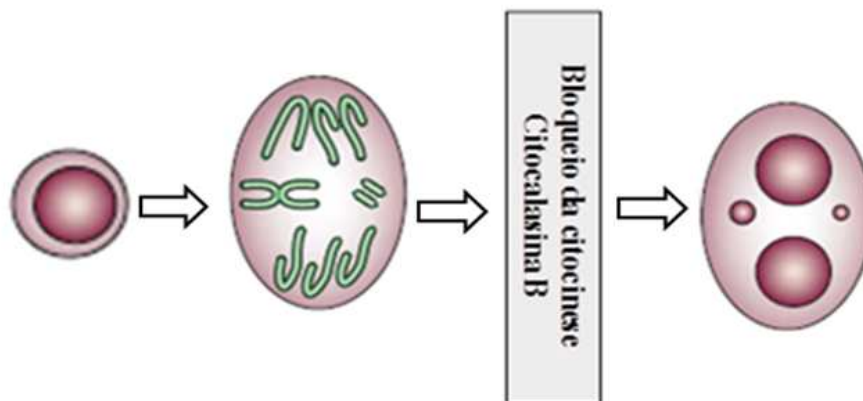
Diversos estudos mostram, uma correlação positiva entre a frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e humanos (CLARE et al, 2006; VAN LEEUWEN, 2011), sendo um ensaio recomendado para a aprovação de novas substâncias por diversas agências regulatórias governamentais.

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, nitroreductases, N-dimetilases, sulfotransferases (KNASMÜLLER et al., 1998). A acetiltransferase é uma enzima envolvida na ativação de aminas 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; BERTOLLETI, 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.

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.

ASSOCIACÃO 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.