

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatalise e
cloração convencional na remoção dos azo corantes Disperse
Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas**

Elisa Raquel Anastácio Ferraz

Ribeirão Preto
2011

RESUMO

ANASTÁCIO FERRAZ, E. R. **Avaliação da eficiência do tratamento com fotoeletrocatalise e cloração convencional na remoção dos azo corantes, Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 de amostras aquosas.** 2011. 158f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Os azo corantes atualmente são considerados um assunto preocupante no que se refere à saúde pública e ambiental, pois quando lançados nos efluentes industriais contaminam o meio ambiente. Infelizmente, o método convencional de tratamento de efluentes têxteis, bem como de águas brutas que os recebem não são capazes de remover de maneira eficaz os corantes bem como sua toxicidade. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do tratamento de amostras aquosas por fotoeletrocatalise em comparação com a cloração convencional como método alternativo de degradação de azo corantes, usando os corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 como modelo. Adicionalmente, foi avaliada a citotoxicidade dos corantes originais em condrócitos bovinos e células HepG2 em cultura em monocamadas e 3D. Para tanto, soluções desses corantes originais, clorados e fotoeletrocatalisados foram avaliadas utilizando ensaios de genotoxicidade/mutagenicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade. Todos os corantes originais e clorados foram genotóxicos para as células HepG2 no ensaio cometa. Para o ensaio com *Salmonella*, a cloração reduziu a mutagenicidade dos corantes para a linhagem YG1041 e aumentou o efeito para a linhagem TA98, exceto o Disperse Red 13 que teve a mutagenicidade reduzida para as duas linhagens após cloração. A fotoeletrocatalise removeu tanto a genotoxicidade quanto a mutagenicidade. Somente o Disperse Orange 1 induziu apoptose pelo ensaio com anexina V, mas essa citotoxicidade foi removida após os tratamentos. Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 foram tóxicos para *D. similis* enquanto somente o Disperse Red 1 foi tóxico para *V. fischeri*, sendo que os tratamentos por cloração e fotoeletrocatalise diminuíram a toxicidade apresentada. Os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 passaram a ser tóxicos para *V. fischeri* após cloração, sendo que a fotoeletrocatalise do Disperse Red 13 também gerou produtos tóxicos para esse organismo. Assim, embora seja um método de tratamento promissor, atenção deve ser dada na avaliação e aplicação da fotoeletrocatalise como um método alternativo à cloração. Os corantes originais Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 diminuíram a atividade mitocondrial dos condrócitos, sendo que o Disperse Red 13 também diminuiu a produção de lactato. Todos os corantes reduziram a atividade mitocondrial das células HepG2 em monocamadas, ao passo que o Disperse Orange 1 deixou de exercer esse efeito no cultivo em 3D. Somente o Disperse Red 13 diminuiu a atividade de desidrogenases das células HepG2 e tal efeito foi observado tanto no cultivo em monocamadas quanto em 3D.

Keywords: Disperse Orange 1, Disperse Red 1, Disperse Red 13, fotoeletrocatalise, cloração, azo corantes, MTT, lactato, CCK-8, monocamadas, 3D.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os corantes têxteis e a contaminação ambiental

A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna e a economia desse bem natural em processos produtivos vem ganhando especial atenção, uma vez que as previsões para os próximos anos da quantidade *per capita* de água são preocupantes. A Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (SABESP) estima que em um futuro próximo a demanda de água será superior à capacidade hídrica dos mananciais do estado (KUNZ et al., 2002, COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO [SABESP], 2009). Este problema ambiental está relacionado não só ao desperdício por mau uso desse recurso, mas também ao lançamento de efluentes industriais e domésticos.

Dentre as indústrias de alto poder poluidor, destacam-se as de tingimento das mais variadas fibras. A tintura de tecidos é uma arte que começou há milhares de anos e a disponibilidade comercial de corantes é enorme. Para atender à demanda do mercado consumidor em relação a cores e tons e a sua resistência, as empresas têxteis têm à sua disposição mais de 10.000 corantes, o que representa um consumo anual de cerca de 700.000 toneladas no mundo (RAJAGURU et al., 1999, GUARATINI, ZANONI, 2000), sendo 26.500 tons somente no Brasil (KUNZ et al., 2002).

A tecnologia moderna no tingimento consiste de várias etapas que são escolhidas de acordo com a natureza da fibra têxtil e as características dos corantes e pigmentos como: estrutura química, classificação, disponibilidade comercial, propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras. Independente das características do(s) corante(s) escolhido(s), todo processo de tintura envolve como operação final uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes (GUARATINI, ZANONI, 2000). Nestes banhos, estima-se que aproximadamente 10 a 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos e alcançam o efluente industrial (RAJAGURU et al., 1999), contaminando o meio ambiente com cerca de um milhão de tonelada destes compostos (SHINTAKU, IMBROISI, SANTOS, 2006).

A principal fonte desta perda corresponde à incompleta fixação dos corantes durante a etapa de tingimento das fibras têxteis (GUARATINI, ZANONI, 2000).

Além do problema relacionado às perdas de corantes durante o processo de tingimento, ainda o setor têxtil apresenta um especial destaque dentro do contexto da poluição ambiental, devido a seu grande parque industrial instalado utilizar grandes volumes de água, gerando por consequência grandes volumes de efluentes (KUNZ et al., 2002). Para se ter uma idéia, sabe-se que aproximadamente 200 litros de água são necessários para cada quilograma de tecido de algodão fabricado (CARNEIRO et al., 2004). Estes efluentes são misturas complexas de muitos poluentes que varia de corantes originais perdidos durante os banhos de tingimento, até praguicidas e metais pesados associados (McMULLAN et al., 2001) e, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação de mananciais (KUNZ et al., 2002). Sendo assim, o que chega aos corpos d'água são efluentes com alta carga orgânica e demanda bioquímica de oxigênio, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, forte coloração e pouca biodegradabilidade. A poluição de corpos d'água com estes compostos provoca, além da poluição visual, alterações em ciclos biológicos da biota aquática, afetando principalmente processos de fotossíntese e oxigenação do corpo d'água, pois dificultam a passagem de luz solar pelas águas (PEREIRA, FREIRE, 2005).

Além deste fato, estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azo corantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (CHUNG, CERNIGLIA, 1992, HOUK, 1992, RAJAGURU et al., 1999, JAGER, HAFNER, SCHNEIDER, 2004, UMBUZEIRO et al., 2005a, UMBUZEIRO et al., 2005b), o que coloca em risco a saúde humana, uma vez que os sistemas de tratamento de efluente e as Estações de Tratamento de Água (ETAs) são ineficazes na remoção da coloração e mutagenicidade de alguns corantes (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004).

1.2 Os corantes têxteis

1.2.1 Classificação dos corantes

A molécula dos corantes se divide em grupo cromóforo, responsável pela cor, e a estrutura responsável pela fixação à fibra. Os corantes podem ser classificados de acordo com o grupamento cromóforo ou pelo seu uso ou método de aplicação,

sendo este o principal sistema adotado pelo *Colour Index* (CI). Dessa forma, de acordo com seu uso ou método de aplicação os corantes se dividem em: corantes reativos, corantes diretos, corantes à Cuba, corantes de enxofre, corantes básicos, corantes solventes, corantes ácidos e corantes dispersivos (OTHMER, 1993). Os corantes estudados neste trabalho são dispersivos com a função azo como grupo cromóforo, caracterizados como corantes orgânicos e que possuem ao menos uma ligação azo, apresentando boa fixação em fibras sintéticas (GUARATINI, ZANONI, 2000). Assim, será dada maior ênfase a esse grupo.

Os corantes dispersivos são corantes não iônicos insolúveis em água aplicados em fibras hidrofóbicas em dispersão aquosa. Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa (finamente dividido) sobre o acetato de celulose. O grau de solubilidade do corante deve ser pequeno, mas definido e influencia diretamente o processo e a qualidade da tintura. Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre este e a fibra hidrofóbica. Esta classe de corantes tem sido utilizada principalmente para tinturas de fibras sintéticas, tais como: acetato celulose, *nylon*, *polyester* e poliacrilonitrila (OTHMER, 1993, GUARATINI, ZANONI, 2000).

1.2.1.1 Os azo corantes

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azo corantes, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) ligados a sistemas aromáticos (KUNZ et al., 2002).

Mais da metade dos corantes produzidos anualmente pertence a esse grupo. Presumivelmente mais de 3000 diferentes azo corantes são usados para tingir vários materiais, sendo que a maior parte é empregada em tingimento de tecidos (STOLZ, 2001). Essa grande utilização se deve ao fato desses corantes permitirem um método de tingimento de fibras celulósicas (especificamente alongadas) com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade em relação às outras classes (GUARATINI, ZANONI, 2000).

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

Toxicidade dos azo corantes

Vários estudos têm demonstrado que além da poluição visual - 10 a 50 mg/L de azo corantes solúveis já são capazes de tornar o corpo receptor altamente colorido - alguns azo corantes e seus produtos de biotransformação têm se mostrado tóxicos (BAE, FREEMAN, 2007).

Outro fato preocupante é a potencialidade de provocar dano ao material genético que alguns corantes desse grupo possuem. Estudos utilizando microorganismos e células de mamíferos têm demonstrado que vários azo corantes apresentam atividade mutagênica e genotóxica (AL-SABTI, 2000, JAGER, HAFNER, SCHNEIDER, 2004, WANG et al., 2005). Essa atividade está intimamente relacionada com a natureza e posição dos substituintes ligados ao grupo azo (CHUNG, CERNIGLIA, 1992). Por exemplo, o 3-metoxi-4-aminoazobenzeno é um potente carcinógeno para ratos e extremamente mutagênico para bactérias, enquanto que o 2-metoxi-4-aminoazobenzeno é aparentemente não carcinogênico e fracamente mutagênico (HASHIMOTO et al., 1977). Como pequenas variações na molécula dos corantes alteram as suas propriedades genotóxicas, é importante que cada azo corante seja testado individualmente (UMBUZEIRO et al., 2005a). Chung e Cerniglia (1992) fizeram uma revisão sobre vários azo corantes já avaliados pelo ensaio *Salmonella*/microsoma, mostrando a importância da estrutura química na mutagenicidade dos azo corantes.

Além disso, aproximadamente 130 de 3200 azo corantes em uso produzem aminas aromáticas carcinogênicas após a clivagem reductiva da ligação azo (BAE, FREEMAN, 2007). No passado, azo corantes baseados em benzidina, 3,3'-diclorobenzidina, 3,3'-dimetilbenzidina e 3,3'-dimetoxibenzidina foram sintetizados em larga escala. Estudos em trabalhadores expostos demonstraram que ocorre azo-

redução desses corantes no homem, o que pode vir a explicar os casos de câncer de bexiga observados (GOLKA, KOPPS, MYSLA, 2004). A redução de azo corantes a aminas aromáticas pode ser catalisada por enzimas da fração microsomal do fígado e também por azoredutases produzidas pela microbiota intestinal (FRANCE, CARTER, JOSEPHY, 1986). Se eles são nitro-azo corantes, eles também podem ser metabolizados pelas nitroredutases produzidas pelos mesmos microorganismos ou por enzimas presentes no citoplasma de células de mamíferos, como as xantinas oxidases, ou ainda, pelo citocromo P450, daí a importância do uso da fração S9 nos testes de mutagenicidade com *Salmonella*, que será discutido posteriormente (NOVOTNY et al., 2006). Entretanto, tem sido mostrado que azoredutases e nitroredutases da microbiota intestinal desempenham um papel mais importante nesse tipo de metabolismo (SWEENEY et al., 1994, UMBUZEIRO et al., 2005a). Desta forma, o intestino delgado é um possível órgão alvo de carcinogênese pela exposição a azo corantes (SWEENEY et al., 1994). Em ambos os casos, se são formadas N-hidroxilaminas, elas são capazes de causar danos ao DNA.

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

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

Devido a esta toxicidade, os corantes que ao serem clivados geram benzidina foram proibidos pela Comunidade Européia (ECOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ASSOCIATION OF DYES AND ORGANIC PIGMENTS MANUFACTURERS [ETAD], 2002). Entretanto, a literatura especializada mostra que devido a problemas econômicos, países menos desenvolvidos como Brasil, México, Índia e Argentina, não cessaram completamente a produção de alguns corantes à base de benzidinas (e.x. Congo Red 14) de grande potencialidade econômica (GUARATINI, ZANONI, 2000). Um estudo realizado recentemente no Brasil demonstrou a presença desta

amina aromática no efluente lançado por uma indústria de tingimento, demonstrando que este composto ainda faz parte dos processos industriais brasileiros (MAZZO et al., 2006).

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo, foi constatado que os azo corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 são mutagênicos para o ensaio de *Salmonella*/microsoma, utilizando as linhagens TA98, YG1041, TA100 e YG1042 (FERRAZ et al., 2010, FERRAZ et al., 2011). Tal mutagenicidade foi significativamente maior com as linhagens TA98 e YG1041, o que mostra que o principal mecanismo de ação mutagênica apresentado pelos três corantes é o deslocamento do quadro de leitura do DNA, tipo de dano identificado por essas linhagens. Além disso, a potência mutagênica com as linhagens superprodutoras de nitroreductase e O-acetiltransferase (YG1041 e YG1042) foi significativamente maior do que as respectivas linhagens que as originou (TA98 e TA100), o que mostra a importância da nitroredução e acetilação na ativação destes compostos (FERRAZ et al., 2010). Esses resultados foram confirmados utilizando o Teste de Micronúcleos em linfócitos humanos e em células HepG2 também realizado por nosso grupo (CHEQUER, 2008, CHEQUER et al., 2009). É importante salientar que estes corantes estão sendo largamente utilizados por indústrias de tingimento no Brasil e há poucas informações na literatura acerca dos mesmos.

1.3 Tratamento de Sistemas Aquosos

Em geral, na indústria têxtil os processos de tratamento de efluentes estão fundamentados na operação de sistemas físico-químicos de precipitação-coagulação, seguidos de tratamento biológico empregando sistemas de lodos ativados. Este processo consiste na agitação dos efluentes na presença de microorganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. Esta forma de tratamento apresenta como vantagem o baixo custo e a possibilidade de tratar grandes volumes de efluentes (KUNZ et al. 2002). Porém, este tratamento é bastante susceptível à composição do efluente, além de produzir um grande volume de lodo (SLOKAR, MARECHAL, 1998, KUNZ et al., 2002, FUKUNAGA, 2003, SABESP, 2009).

Antes de ser tratado, o efluente passa por grades para retirar os resíduos maiores e então é encaminhado para o filtro de areia e cascalho onde será filtrado.

Após este processo, o efluente passa para o decantador primário no qual ocorrerá a sedimentação de partículas mais pesadas. No tanque de aeração, próxima etapa do tratamento, o ar fornecido faz com que os microorganismos ali presentes multipliquem-se e alimentem-se de material orgânico formando o lodo. Parte do lodo depositado retorna ao tanque de aeração (por isso a designação de “lodo ativado”) e a outra parte passa por um processo de secagem através de um leito de secagem ou filtro prensa. O lodo seco é acumulado em um reservatório e em seguida levado para ser incinerado. Do tanque de aeração o efluente vai para o decantador secundário, onde o lodo formado deposita-se no fundo (KUNZ et al., 2002).

A Figura 1 ilustra o esquema de tratamento por lodo ativado, tipicamente empregado para tratamento de efluente têxtil.

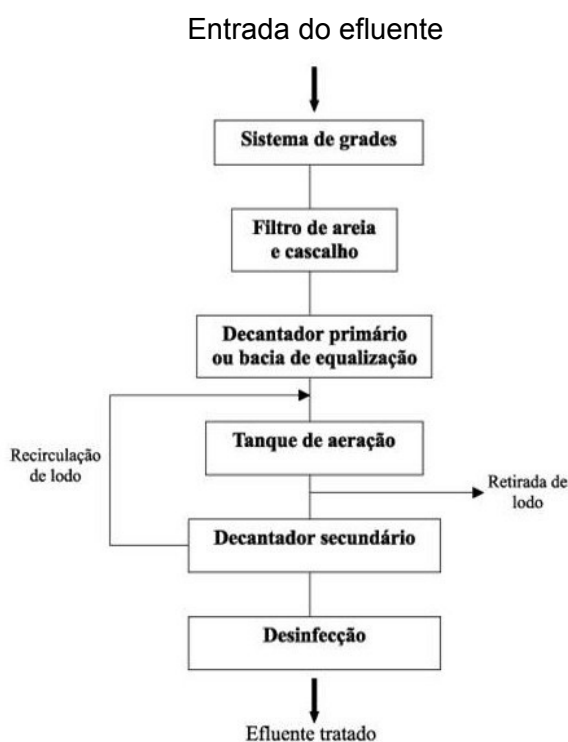


FIGURA 1. Representação esquemática de uma estação de tratamento de efluente utilizando lodos ativados (Fonte: KUNZ et al., 2002).

Porém, devido às já citadas exigências do mercado consumidor em relação à durabilidade das cores nas fibras, as moléculas dos corantes são extremamente estáveis e na maioria das vezes os microorganismos empregados no tratamento biológico não são capazes de metabolizá-las. Shaul et al. (1991) estudaram a eficácia do tratamento convencional de efluentes têxteis. Dos 18 azo corantes

estudados, 11 passaram através do processo de lodo ativo praticamente sem serem tratados, 4 (Acid Blue 113, Acid Red 151, Direct Violet 9 e Direct Violet 28) foram adsorvidos no lodo ativo e somente 3 (Acid Orange 7, Acid Orange 8 e Acid Red 88) foram biodegradados. Oliveira et al. (2007) analisaram o efluente de uma indústria de tingimento antes e após o tratamento. Os autores mostraram que o sistema de tratamento empregado não era eficaz na remoção total dos corantes nem tampouco da mutagenicidade detectada no efluente tratado lançado, contaminando a água bruta. Lima et al. (2007), observaram que ratos Wistar expostos a uma amostra de efluente coletado na mesma indústria estudada por Oliveira et. al., (2007) apresentaram aumento na incidência de criptas aberrantes no cólon, que é um biomarcador precoce de carcinogenicidade.

Devido à baixa eficácia do tratamento por lodos ativados, os efluentes continuam tendo coloração intensa após o tratamento. No Brasil, atualmente o padrão de lançamento de efluentes da Legislação Brasileira não estabelece valores numéricos para o parâmetro cor, porém determina que o despejo industrial não deva alterar a cor do corpo receptor (BRASIL, 2005). Assim, substâncias branqueadoras como hidrossulfito de sódio, ácido hipocloroso e, principalmente cloro são frequentemente adicionadas ao efluente com o intuito de desinfetar e remover ou reduzir a cor do mesmo, a fim de atender aos padrões de lançamento. Embora muito utilizada, essa prática de clorar os efluentes pode gerar compostos mutagênicos incolores, que podem contaminar tanto a água bruta quanto a tratada em casos de captação de águas contendo estes compostos, como já demonstrado por Oliveira et al. (2006) e discutido posteriormente neste trabalho.

Além dos inconvenientes deste tipo de tratamento no que diz respeito à remoção da cor e da toxicidade, os processos de tratamento convencionais com lodos ativados utilizados na indústria têxtil são não destrutivos, visto que eles só transferem compostos orgânicos da água para outra fase, causando poluição secundária (KUNZ et al., 2002, KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004). Conseqüentemente, é necessária a regeneração dos materiais adsorvidos e pós-tratamento dos resíduos sólidos, que são operações de alto custo.

Sabe-se que a qualidade da água tratada para abastecimento público está estreitamente relacionada com a qualidade da água bruta. Uma vez lançados em corpos d'água utilizados na captação de água para abastecimento, os corantes

atingem as ETAs, que também usam a cloração como método de tratamento e assim, não são capazes de removê-los de forma eficiente assim como seus produtos mutagênicos. Umbuzeiro et al., (2004, 2005b) em um estudo realizado no Ribeirão dos Cristais, região metropolitana de São Paulo, detectaram atividade mutagênica na água tratada fornecida para a população de Cajamar. Essa contaminação foi relacionada à presença de corantes na água bruta, ocasionada pelo lançamento de efluente mutagênico proveniente de uma indústria de tingimento, localizada a 6 km da captação da ETA (UMBUZEIRO et al., 2004). Seguindo os estudos de Umbuzeiro et al., (2004), Oliveira et al., (2006) detectaram a presença de corantes do tipo azo na água tratada fornecida à população. Os autores detectaram ainda substâncias mutagênicas incolores geradas após a etapa de cloração da água, supostamente semelhante aos 2-fenilbenzotriazóis (PBTAs). Estes são compostos genotóxicos formados a partir de azo corantes, utilizados principalmente em unidades de tingimento de produtos têxteis, e podem ser produzidos durante o próprio processo industrial, ou em estações municipais de tratamento de efluentes ou esgotos (KUMMROW, UMBUZEIRO, 2008, SHIOZAWA et al., 1999), conforme será discutido no item 1.3.1.

O processo de cloração para desinfecção de água para o consumo humano possui um problema intrínseco, independente da contaminação de mananciais por corantes. Quando a água bruta captada rica em matérias húmicas e fúlvicas é clorada, produtos tóxicos e mutagênicos são gerados, os chamados produtos secundários de desinfecção ou *disinfection by-products* (DBPs) que são legislados pela Portaria n. 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). Alguns desses compostos são comprovadamente carcinogênicos para humanos e animais (BAYO, ANGOSTO, LÓPEZ, 2009). Embora trihalometanos (THMs) e ácidos haloacético constituem as duas maiores classes de DBPs identificados em água, nos últimos 30 anos mais de 600 DBPs diferentes têm sido relatados na literatura (RICHARDSON et al., 2007).

1.3.1 Sistema de desinfecção convencional com cloro

Conforme citado anteriormente, a cloração de corantes é um problema ambiental. O método de oxidação química utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl) ou cloro gás, baseia-se no ataque eletrofílico ao grupo amino e subsequente clivagem

do grupamento cromóforo, que no caso dos corantes estudados no presente trabalho é a ligação azo (SLOKAR, MARECHAL, 1998). Segundo Slokar e Marechal (1998), o tratamento de corantes pertencentes ao grupo dos reativos através dessa metodologia requer um período de tempo maior, enquanto soluções de corantes com complexos metálicos (*metal-complex dyes*) permanecem parcialmente coloridas. Ainda, de acordo com os mesmos autores, os corantes dispersivos permanecem coloridos quando se usa o NaOCl.

Além disso, Shiozawa et al. (1999) demonstraram que a redução de azo corantes por hidrossulfito de sódio e sucessivas etapas de cloração com ácido hipoclorídico podem formar benzotriazóis derivados do 2-fenilbenzotriazol (PBTA) e aminas aromáticas altamente mutagênicas, muitas vezes mais mutagênicas do que o corante de origem (SHIOZAWA et al. 1999). No meio ambiente aquático, esta etapa de redução dos corantes pode ocorrer em dois momentos: 1) Aplicação de agentes redutores na fibra recém-tingida para a retirada do excesso de corante não acoplado à fibra e que poderia levar ao “sangramento” dos tecidos no momento da lavagem. 2) Utilização dos agentes redutores como agente branqueador do efluente, visando atender à legislação. Esse efluente contendo os corantes reduzidos e sem cor, sendo enviado a uma estação de tratamento de esgoto municipal, que clora seus efluentes antes de liberá-los para os corpos d’água, poderá gerar os PBTAs. Vários PBTAs diferentes já estão descritos na literatura, e suas estruturas químicas variam de acordo com os corantes que os originou (SHIOZAWA et al. 1999, OLIVEIRA, 2005).

1.3.2 Processos oxidativos avançados (POAs)

Tendo em vista todos esses inconvenientes nos sistemas tradicionais de tratamento de efluentes, processos alternativos vêm sendo estudados na degradação dos corantes em sistemas aquosos nos últimos anos, com destaque aos processos oxidativos avançados (POAs).

POAs como reações catalíticas usando Fenton e foto-Fenton, processos utilizando H_2O_2/UV e fotocatalise mediada por TiO_2 têm sido estudados sob várias condições experimentais a fim de reduzir a cor e carga orgânica dos efluentes (KONSTANTINOU, ALBANIS, 2004).

A oxidação química tem como objetivo a mineralização dos contaminantes a dióxido de carbono, água e inorgânicos ou, pelo menos, a sua transformação em produtos menos prejudiciais (ANDREOZZI et al., 1999). Um dos principais agentes oxidantes é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Entretanto, este agente precisa ser ativado por alguns meios como, por exemplo, luz ultravioleta, ozônio, peroxidase entre outros, objetivando a formação de espécies reativas, responsáveis pela oxidação. Existem muitos métodos de descolorização química e estes variam de acordo com a forma na qual o H_2O_2 foi ativado (SLOKAR, MARECHAL, 1998, ROBINSON et al., 2001). Assim, os POAs consistem na geração de espécies muito reativas, como radicais hidroxila ($\bullet OH$) a partir do H_2O_2 , que oxidam uma variedade de poluentes de maneira rápida e não seletiva, característica esta muito importante para um oxidante usado no tratamento de efluentes e para a solução de problemas de poluição ambiental. Os radicais hidroxila são espécies extremamente reativas que atacam a maior parte das moléculas orgânicas de forma constante, geralmente na ordem de $10^6 - 10^9 M^{-1}s^{-1}$ (ANDREOZZI et al., 1999, FUKUNAGA, 2003).

1.3.2.1 Fotocatálise heterogênea usando TiO_2

Entre os POAs, a fotocatálise heterogênea usando TiO_2 como fotocatalisador aparece como a tecnologia destrutiva mais emergente. A vantagem-chave desse processo é sua natureza destrutiva inerente: não envolve transferência de massa, pode ser executado sob condições ambientais (oxigênio atmosférico é usado como oxidante), pode conduzir à completa mineralização do carbono orgânico em CO_2 , não requer a adição de produtos químicos, não há geração de lodo e nem subprodutos tóxicos, além de promover a despoluição em curto espaço de tempo (FUKUNAGA, 2003, KONSTANTINO, ALBANIS, 2004). Além disso, TiO_2 é largamente disponível, barato, absorve radiação UV em comprimentos de onda < 380 nm, tem potencial redox da banda de valência adequado para catalisar diversas reações, é resistente à corrosão em ampla faixa de pH, não-tóxico e mostra alta estabilidade química (KONSTANTINO, ALBANIS, 2004).

Embora as reações fotocatalíticas redox sobre superfícies semicondutoras apresentem particularidades, de um modo geral se processa segundo as etapas básicas de excitação com luz de energia maior que o *band gap* (E_g) (quantidade de energia necessária para que o semicondutor passe a conduzir corrente elétrica) do

semicondutor, geração de pares de elétron/lacuna (e^-/h^+); aprisionamento de elétrons e lacunas pelas espécies adsorvidas; reações redox entre espécies adsorvidas e cargas fotogeradas e dessorção dos produtos da reação redox e regeneração do semicondutor, conforme mostra a Figura 2 (ZIOLLI, JARDIM, 1998).

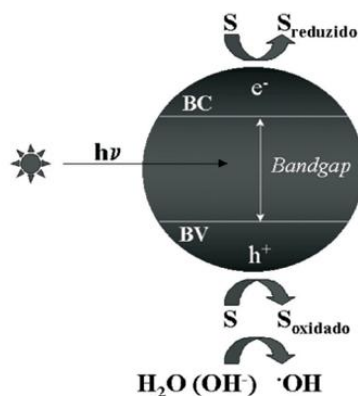


FIGURA 2. Representação esquemática dos processos envolvidos na fotocatalise, onde $h\nu$ é a energia aplicada, S é a espécie adsorvida, BC é a banda de condução e BV a banda de valência (Fonte: TAUCHERT, ZAMORA, 2004).

1.3.2.2 Fotoeletrocatalise usando TiO_2 como fotocatalisador

A oxidação fotoeletrocatalítica é a combinação das tecnologias eletroquímicas e fotoquímicas e tem sido investigada como uma forma atrativa para aumentar a eficiência da fotocatalise na degradação de poluentes orgânicos (OSUGI et al., 2005). A vantagem da fotoeletrocatalise em relação à fotocatalise é a aplicação de um potencial através de um fotoeletrodo no qual o catalisador está apoiado. Essa configuração permite a separação mais efetiva das cargas geradas (e^-/h^+) deste processo, aumentando assim o tempo de vida dos pares elétrons-lacunas. Apesar dessa vantagem, poucos estudos têm sido conduzidos na aplicação dessa nova tecnologia para a degradação dos corantes têxteis (ZANONI, SENE, ANDERSON, 2003, OSUGI et al., 2005).

Comumente, esse processo é baseado na reação fotoquímica que acontece na superfície do TiO_2 sob um fóton incidente de luz UV com energia $h\nu$, responsável por criar um par de elétron. Sob um potencial positivo aplicado, o elétron é dirigido de forma mais eficaz para o contra eletrodo (rede de platina) enquanto a lacuna pode reagir com H_2O/OH para gerar um radical $OH\cdot$ com grande poder oxidante (CARNEIRO et al., 2005). Grupos de água adsorvida/ OH estão disponíveis como doadores de elétron para o radical hidroxil ($OH\cdot$) enquanto o oxigênio pode agir

como um aceptor de elétron para formar o íon radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Ambas as espécies são fortemente oxidantes e capazes de degradar compostos aromáticos como corantes têxteis (CARNEIRO et al., 2004). A Figura 3 ilustra um reator fotoeletrocatalítico.

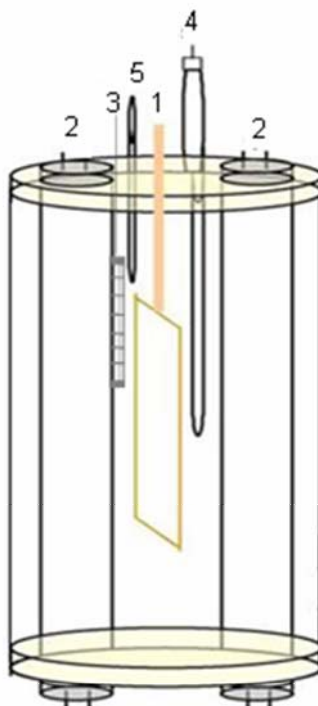


FIGURA 3: Reator fotoeletrocatalítico. Fotoanodo de Ti/TiO₂ preparado pelo método de sol-gel (eletrodo de trabalho) (1) iluminado por duas lâmpadas germicidas comerciais Phillips de 4Wcm⁻² operando como fonte de luz UV (315–400 nm) montada a 5 cm em frente de cada lado do eletrodo de trabalho na célula (2). A rede de platina usada como contra eletrodo (3) e um eletrodo de referência colocado perto do eletrodo de trabalho (4). (5) Ar comprimido. A amostra fica dentro do reator, juntamente com o sal Na₂SO₄ dissociado, responsável pelo trânsito de elétrons (Fonte: modificado de OSUGI et. al., 2006).

A potencialidade da técnica de fotoeletrocatalise na oxidação fotoeletrocatalítica de corante reativo da família azo vem sendo investigado pelo grupo de eletroanalítica da UNESP de Araraquara com resultados bastante promissores (CARNEIRO et al., 2005, OSUGI et al., 2005). Os melhores resultados foram obtidos para o uso de fotoeletrodos construídos de titânio metálico recobertos com nanocamadas de TiO₂ (forma anatase) sob potencial controlado e luz ultravioleta. O dióxido de titânio é preparado pelo método sol-gel e revestido por uma variedade de suportes para produzir finos filmes de fotoeletrodo. Além da estabilidade eletroquímica, esses novos eletrodos têm grande área de superfície

interna, o que contribui para maior eficiência da descontaminação de poluentes orgânicos (CARNEIRO et al., 2005, OSUGI et al., 2005).

A Figura 4 mostra a micrografia eletrônica de varredura da superfície do filme de nanotubos de TiO₂.

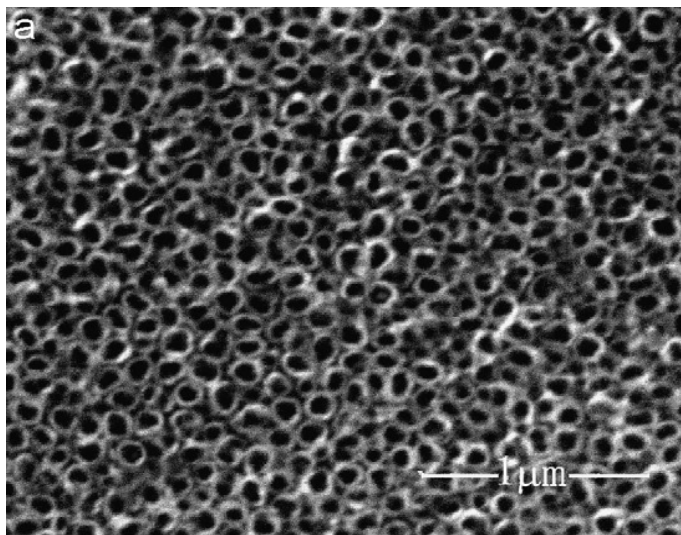


FIGURA 4. Micrografia eletrônica de varredura da superfície do filme de TiO₂ obtido de anodização (Fonte: LU et al., 2008).

1.4 Ensaios toxicogenéticos, citotóxicos e ecototóxicos

Tendo em vista todo o potencial tóxico dos azo corantes e a dificuldade de removê-los dos efluentes industriais pelo método de lodo ativo assim como a ineficiência da cloração na remoção destes compostos na produção de água tratada além da geração de compostos incolores desconhecidos, este trabalho avaliou a eficiência do tratamento por fotoeletrocatalise na degradação dos três azo corantes estudados pelo nosso grupo: Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13. A eficiência deste tratamento foi comparada com a cloração convencional simulando as condições das ETAs.

A fim de verificar a eficiência da fotoeletrocatalise comparada com a cloração convencional, a toxicidade genética dos produtos dos tratamentos foi avaliada pela detecção de diferentes tipos de dano ao DNA, utilizando o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* que detecta mutações de ponto e o ensaio do cometa que detecta quebra de fita de DNA. Por se tratar de uma estratégia nova de tratamento, é importante que outros *endpoints* além da mutagenicidade sejam avaliados. Por isso, este trabalho também avaliou a capacidade de indução de morte celular por

apoptose pelos corantes originais e tratados utilizando o ensaio Anexina V/PI em HepG2. Além disso, também foi avaliada a ecotoxicidade destes compostos utilizando os ensaios com *Daphnia similis* e Microtox[®].

Adicionalmente, a citotoxicidade dos corantes originais Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 foi analisada utilizando os ensaios MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) e lactato em condrócitos bovinos em monocamadas e os ensaios MTT e CCK-8 (Cell Counting Kit -8) em HepG2 em monocamadas e em 3D. Essa parte do trabalho foi desenvolvida durante meu doutorado sanduíche realizado na Universidade de Oxford e na empresa Zyoxel LTDA em Oxford, Inglaterra. As amostras dos corantes clorados e fotoeletrocatalisados não puderam ser avaliadas durante esse período porque estas degradam após aproximadamente dois meses mesmo quando mantidas sobre refrigeração.

1.4.1 Genotoxicidade e Mutações

Uma substância é dita genotóxica quando tem a capacidade de reagir com o DNA diretamente ou após sua ativação metabólica, produzindo danos em sua estrutura e/ou função (WEISBURGER, 1999). Quando esses danos são transmitidos à descendência diz-se que ocorreu uma mutação (SANTELLI, 2003). As mutações fornecem a variação genética na qual a seleção da evolução opera (GRIFFITHS, et al., 2001a). Porém, elas são responsáveis por várias doenças hereditárias humanas, entre elas o câncer (GRIFFITHS, et al., 1998a). Sua ocorrência se dá de maneira espontânea ou induzida por mutágenos (LEWIS, 2004).

Níveis em que ocorre uma mutação

Uma mutação pode ocorrer em dois níveis diferentes:

- Mutação cromossômica: segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros ou mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram (GRIFFITHS, et al., 1998a).
- Mutação gênica: os eventos mutacionais ocorrem dentro de genes individuais (GRIFFITHS, et al., 1998a). É também denominada de mutação de ponto, uma vez que as alterações ocorrem em pares de bases únicos do DNA ou num pequeno número de bases adjacentes (GRIFFITHS, et al., 2001b). O

ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, utilizado neste trabalho, detecta mutações de ponto. Assim, esta forma de mutação será mais detalhada a seguir.

Tipos de mutação de ponto

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

As células vivas desenvolveram uma série de sistemas enzimáticos que reparam o DNA danificado por uma variedade de mecanismos. Alguns sistemas enzimáticos neutralizam compostos potencialmente danosos antes que eles reajam com o DNA (GRIFFITHS, et al., 2001b). Outros já agem sobre o próprio dano no DNA (BROWN, 1999). Uma falha nestes sistemas pode levar a uma maior taxa de mutação (GRIFFITHS, et al., 1998b).

Baseado no exposto, quando acontece um dano no DNA, vários são os eventos que podem ocorrer, como ilustrado na Figura 5. Em células sob proliferação, será ativado o ciclo celular, conduzindo a um bloqueio no mesmo, o que fornecerá tempo para que o mecanismo de reparo seja ativado. Em células diferenciadas o sistema de reparo será ativado diretamente. Quando o reparo é completo, a célula poderá prosseguir o seu ciclo. Se o dano não puder ser reparado ou se houver muitas lesões no DNA, o ciclo celular poderá ser bloqueado permanentemente, conduzindo ao envelhecimento da célula ou induzindo apoptose. Se lesões não reparadas permanecerem sem serem detectadas, acarretará o aparecimento de mutações e instabilidade genômica, o que poderá conduzir à oncogênese (HOUTGRAAF, VERSMISSEN, GIESSEN, 2006).

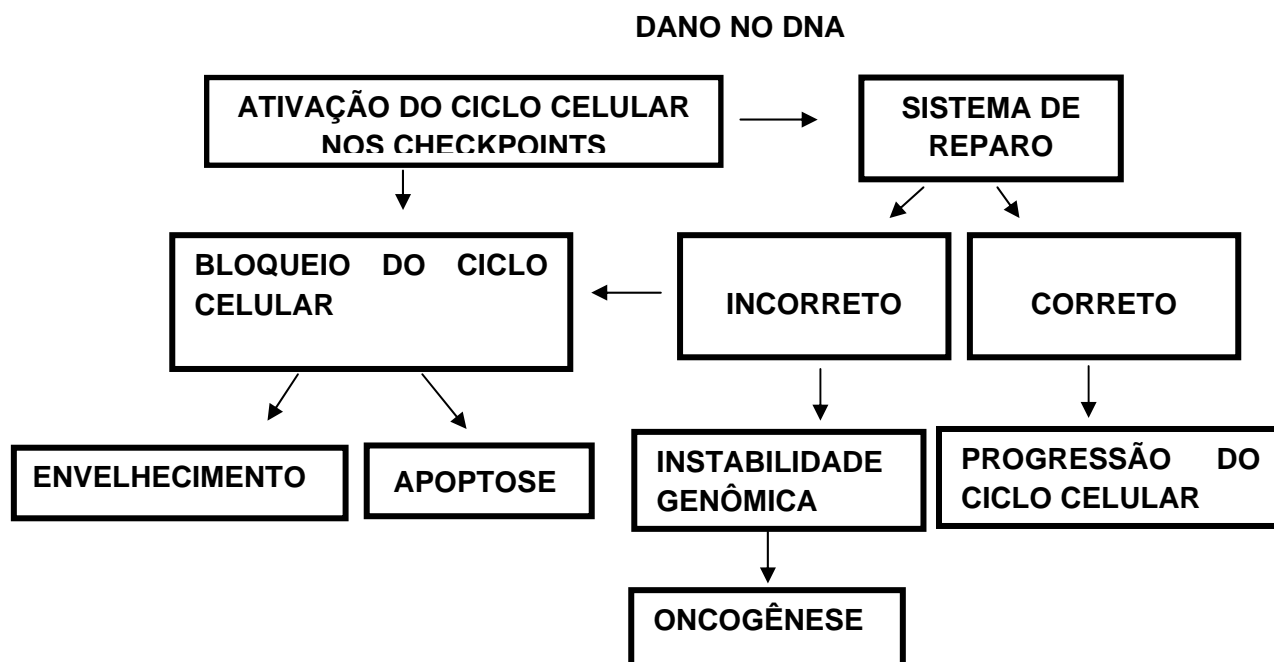


FIGURA 5. Fluxograma da resposta celular para os diferentes tipos de dano ao DNA (Fonte: HOUTGRAAF, VERSMISSEN, GIESSEN, 2006).

1.4.2 Ensaio do cometa

Nas últimas décadas, diversas metodologias para avaliação de danos ao DNA têm sido desenvolvidas e, dentre elas, o ensaio do cometa tem sido considerado como uma das mais eficientes ferramentas para tal finalidade. Este destaque é devido ao teste ser sensível, rápido e econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (KOSZ-VNENCHAK, ROKOSZ, 1997, SASAKI et al., 1997, MITCHELMORE, CHIPMAN, 1998). O ensaio não é empregado para detectar mutagenicidade, mas sim lesões genômicas (genotoxicidade) que, após serem processadas, podem se tornar mutações. Desta maneira, o ensaio do cometa tem sido indicado como um método apto a detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (GONTIJO, TICE, 2003, KOPPEN et al., 1999).

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros pesquisadores a desenvolverem uma metodologia capaz de mensurar danos no DNA em células individuais com a utilização da eletroforese em gel. Para o sucesso de tal técnica, os pesquisadores consideraram o comportamento da molécula de DNA em células individualizadas, bem como sua organização dentro do núcleo. Deste modo, as

células foram embebidas em agarose e dispostas em uma lâmina de microscopia, tendo as membranas lisadas por detergentes, as proteínas nucleares extraídas por altas concentrações de sais e, conseqüentemente, a liberação do DNA. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese sob condições neutras e os nucleóides migraram em direção ao anodo. As células com alta frequência de quebras no DNA apresentaram migrações em diferentes velocidades pelos diferentes fragmentos de DNA com diferentes tamanhos, gerando a aparência de uma cauda de cometa. Ao contrário, as células sem danos não apresentaram essas caudas e são chamadas nucleóides. Entretanto, esta técnica permite somente a detecção de quebra de fita dupla de DNA, o que limita o método (ROJAS, LOPES, VALVERDE, 1999). Em 1989 Singh e colaboradores inovaram este método, utilizando a eletroforese em pH alcalino ($\text{pH} > 13$), o que tornou possível a detecção de quebra de fita simples e sítio álcali-lábeis, aumentando assim a sensibilidade do método, visto que quase todos os compostos genotóxicos induzem mais esses tipos de danos do que quebra de fita dupla de DNA. Hoje, conforme o pH da eletroforese, o teste do cometa pode detectar quebras de fita dupla e simples, ligações cruzadas, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos e excisão de sítios incompletos de reparo (TICE et al., 2000, GONTIJO, TICE, 2003, COLLINS, 2004).

Além do baixo custo, alta sensibilidade e fácil execução, o grande uso desse ensaio pode ser explicado pela flexibilidade quanto aos tipos de células que podem ser usadas. Qualquer célula eucariota pode ser utilizada nos ensaios (TICE et al., 2000).

1.4.3 Teste de mutagenicidade com *Salmonella*

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames ou Ensaio *Salmonella*/microsoma) (MARON, AMES, 1983) é um teste de curta duração utilizado para detectar substâncias que podem causar mutações de ponto. Está em uso por mais de 20 anos devido à sua alta sensibilidade (83%) e reconhecida validação (JARVIS, et al., 1996, KAPLAN et al., 2004). Além disso, é recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental para proteção da saúde humana e do meio ambiente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004) e reconhecido por comunidades científicas, agências e corporações governamentais (MORTELMANS, ZEIGER,

2000). É usado mundialmente como um ensaio inicial para determinar a mutagenicidade de novas drogas e substâncias químicas porque há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

Assim, esse teste pode ser aplicado para a avaliação da qualidade do ar, esgoto, sedimentos, efluentes do processo industrial, água para consumo humano, tecidos animais, solos (JARVIS, et al., 1996), além de produtos químicos, naturais, sintéticos e fitoterápicos (SBMCTA, 2004).

As linhagens de *Salmonella* usadas no teste sofrem mutações nos genes responsáveis pela biossíntese da histidina e como resultado não conseguem produzir esse aminoácido. Outra mutação é necessária para fornecer subsídios às células bacterianas e permitir que elas cresçam na ausência do referido aminoácido. Essa mutação ocorre quando as bactérias usadas são expostas a agentes mutagênicos (MARON, AMES, 1983).

Bactérias não têm o sistema de oxidação via citocromo P450 usado pelos vertebrados na biotransformação de xenobióticos. Como alguns dos metabólitos produzidos pelo citocromo P450 associado com enzimas são mutagênicos, é importante mimetizar esse sistema nos ensaios com bactérias através da adição da fração S9. Nos casos em que se associa o Teste de Ames com ativação metabólica exógena, esta é feita mediante adição de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com Aroclor-1254 (mistura S9). Assim, as substâncias que exercem sua atividade mutagênica após metabolização via citocromo P450 serão detectadas pela adição de S9 e os mutágenos que não precisam ser metabolizados por essa via para exercerem seu efeito mutagênico, serão identificados sem S9 (MARON, AMES, 1983, JARVIS, et al., 1996).

Linhagens de *Salmonella typhimurium*

As linhagens de *Salmonella* usadas no ensaio pertencem ao grupo de Enterobactéria capazes de produzir azoredutase e nitroredutase, especialmente desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA (MARON, AMES, 1983, CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL [CETESB], 1997, UMBUZEIRO et al., 2005a).

Assim, o ensaio *Salmonella*/microsoma, apesar de ser um teste bacteriano, é uma ferramenta importante capaz de predizer os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria com características metabólicas similares à microbiota intestinal de mamíferos (OLIVEIRA, 2005, UMBUZEIRO et al., 2005a).

Outro fator importante é que as linhagens usadas podem reverter espontaneamente a auxotrofia para histidina (His⁻) e assim podem crescer em um meio pobre no referido aminoácido. Esta é uma reversão espontânea relativamente fraca que pode ser aumentada através de mutações. Cada linhagem tem uma faixa característica de reversão espontânea. O aumento desta taxa permite avaliação da mutagenicidade das substâncias analisadas (MARON, AMES, 1983, MORTELMANS, ZEIGER, 2000, GAHYVA, JUNIOR, 2005).

As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos. A escolha de outras linhagens depende da disponibilidade e tipo da amostra, do foco do estudo e do conhecimento prévio do material a ser testado (CLAXTON et al., 1987, MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

A Tabela 1 mostra as características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste trabalho. A escolha dessas linhagens baseou-se em estudos anteriores realizados por nosso grupo, os quais demonstraram que estas são as mais sensíveis aos corantes aqui estudados (FERRAZ et al., 2010, FERRAZ et al., 2011).

TABELA 1. Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma empregadas no presente trabalho.

Linagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	<i>hisD3052</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , Δ <i>bio</i> ³ , Δ <i>uvrB</i> ⁴ , pKM101 (Ap ^r) ⁵	Deslocamento do quadro de leitura	Maron e Ames (1983)
YG1041	<i>hisD3052</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , Δ <i>bio</i> ³ , Δ <i>uvrB</i> ⁴ , pKM101 (Ap ^r) ⁵ , com alta produção de nitroredutase e O-acetiltransferase (pYG233) (Cn ^r) ⁶	Deslocamento do quadro de leitura	Umbuzeiro et al. (2005a) e Cerná et al. (1991)

¹ *his* mutação responsável pela síntese da histidina

² *rfa* permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

³ dependência à biotina

⁴ Δ *uvrB* deleção do gene *uvrB*

⁵ Ap^r ampicilina resistente

1.5 Avaliação da citotoxicidade

Citotoxicidade é a expressão de efeitos adversos na estrutura e/ou função de um ou mais componentes da célula. Segundo Ekwall (1983), a toxicidade exercida pela maioria dos compostos químicos é uma consequência de alterações não específicas nas funções celulares, o que pode afetar funções específicas de certos órgãos (EKWALL, 1983).

Muitos compostos químicos exercem seus efeitos tóxicos por interferirem nas estruturas ou funções celulares que são comuns a todos os tecidos (citotoxicidade basal) e/ou por afetarem estruturas ou funções de células específicas de um tecido (citotoxicidade tecido-específica) (GARLE, FENTEM, FRY, 1994). Vários são os mecanismos pelos quais os compostos citotóxicos podem causar danos às células, dentre eles pode-se citar: interferência na integridade das membranas e citoesqueleto, no metabolismo, na síntese e degradação ou liberação de constituintes ou produtos celular, na regulação de íon e na divisão celular (SEIBERT et al., 1996). Aqueles que afetam o metabolismo de energia celular, homeostase de Ca^{2+} e estado redox e finalmente causam necrose, podem também induzir apoptose (WYLLIE, 1997).

Apoptose é um processo normal no qual os organismos pluricelulares mantêm a homeostasia dos seus tecidos. Esse processo é também importante para a regulação do sistema imune e para a eliminação de células infectadas por patógenos (PIRET et al., 2004). A maioria das células de um organismo morre por apoptose (IGNEY, KRAMMER, 1999). Entretanto, anormalidades na regulação deste evento podem conduzir a patologias como doenças autoimunes, neurodegenerativas, AIDS e câncer (PIRET et al., 2004, ELMORE, 2007). A apoptose é um processo coordenado e dependente de energia que envolve a ativação de um grupo de cisteína proteases chamadas caspases e uma cascata complexa de eventos (ELMORE, 2007). É muito importante ressaltar que além de auxiliar nos estudos de citotoxicidade, a verificação de morte por apoptose é muito útil para avaliar a capacidade de uma célula fixar uma mutação. Assim, a deficiência da célula em sofrer apoptose contribui com a carcinogênese, uma vez que a supressão da apoptose pode desencadear a iniciação de tumores, além de sua progressão e metástase (LOWE, LIN, 2000). Dessa forma, é possível identificar

células pré-dispostas ao desenvolvimento do câncer quando expostas a agentes mutagênicos (EGUCHI et al., 1997).

Já a morte celular por necrose, ao contrário, segue um caminho independente de energia. Esses dois processos podem ocorrer independentemente, sequencialmente ou simultaneamente. Em alguns casos os tipos e/ou o grau de estímulo que determina se a célula morre por necrose ou apoptose (ELMORE, 2007).

Na necrose as células incham e a membrana plasmática se rompe o que resulta na liberação do conteúdo citoplasmático para os tecidos vizinhos e recrutamento de células inflamatórias, desencadeando um processo inflamatório. Uma vez que na apoptose a membrana permanece íntegra e as células são rapidamente fagocitadas por macrófagos ou células normais adjacentes, não há reação inflamatória (ELMORE, 2007).

Nos últimos anos pesquisas têm sido conduzidas no intuito de desenvolver e avaliar o uso de testes *in vitro* como pré-triagem e até mesmo substituição dos ensaios *in vivo* (EKWALL, 1983, PHILLIPS et al., 1990, SEIBERT et al., 1996).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizam vários princípios diferentes. Podem-se citar os ensaios que utilizam marcadores de fluorescência para detectar substâncias liberadas das células que sofreram danos como o ensaio com anexina V, testes de determinação da viabilidade celular através da clivagem de sais tetrazolium como o MTT, ensaios que detectam a liberação de enzimas intracelulares, como a lactato desidrogenase (LDH) dentre vários outros (SCHAFER et al., 1997).

1.5.1 Cultura de células em três dimensões (3D)

A maioria dos testes usados para avaliar o metabolismo e toxicidade de fármacos e a toxicidade de xenobióticos utilizam modelos animais (*in vivo*) (ELKAYAM et al., 2006). Entretanto, testes em animais são caros, eticamente controversos e nem sempre prediz a resposta em humanos (PAMPALONI, STELZER, 2009). Assim, ensaios baseados no cultivo de células (*in vitro*) são considerados como uma boa alternativa (ELKAYAM et al., 2006, PAMPALONI, STELZER, 2009, LAN, MROCZKA, STARLY, 2010).

Os testes *in vitro* convencionais geralmente usam o cultivo de células em monocamadas no qual as células crescem aderidas na superfície de frascos plásticos ou de vidro num sistema estático (CUI et al., 2007, PAMPALONI, STELZER, 2009, LAN, MROCZKA, STARLY, 2010). Entretanto, esse sistema de cultivo não reproduz a arquitetura do tecido *in vivo* nem prevê a toxicidade órgão-específica; além disso, a sinalização mecânica e bioquímica e a comunicação célula-célula são perdidas (MAZZOLENI, DI LORENZO, STEIMBERG, 2009, PAMPALONI, STELZER, 2009). Tais prejuízos podem ser atribuídos ao fato do cultivo em monocamadas oferecer às células um ambiente não fisiológico, forçando-as a se adaptarem em meio um artificial, plano e rígido (MAZZOLENI, DI LORENZO, STEIMBERG, 2009).

Em 1951 já se percebia limitações do cultivo em monocamadas, o que fez com que Leighton retomasse a idéia original de Carrel's (1912) acerca do cultivo de células em 3D e desenvolvesse melhorias (HOFFMAN, 1994). A partir daí várias foram as descobertas e melhorias envolvendo o cultivo de células em 3D (MOSCONA, 1957, INCH, MCCREDIE, SUTHERLAND, 1970, DURAND, BROWN, 1980, STEEG, ALLEY, GREVER, 1994, PAMPALONI, STELZER, 2009, LAN, MROCZKA, STARLY, 2010). Além disso, esforços têm sido feitos para aperfeiçoar esse tipo de cultura em ensaios toxicológicos, visto que estes permitirão predizer o efeito de toxicantes em humanos com maior precisão do que culturas em monocamadas (PAMPALONI, STELZER, 2009). Atualmente têm-se vários modelos de cultivo de células em 3D, dentre eles pode-se citar:

Culturas em 3D baseadas em hidrogel

Os tecidos dos organismos vivos são compostos de células e matriz extracelular (ECM) (colágenos, elastina, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, etc.) (SMETANA, 1993). A interação célula-célula e célula-matriz extracelular é feita através da sinalização bioquímica e mecânica. Tal interação estabelece uma rede de comunicação em 3D que mantém a especificidade e homeostasia do tecido (PAMPALONI, REYNAUD, STELZER, 2007).

Hidrogéis de matriz extracelular para cultura celular em 3D mimetizam as propriedades bioquímicas e mecânicas dos tecidos, o que confronta as células com um ambiente mais fisiológico do que quando em cultivo em monocamadas. Assim, a

relação entre a função celular e arquitetura do tecido pode ser isolada. Hidrogéis de matriz extracelular podem ser de origem animal, sintética ou ambos. Dentre eles pode-se citar colágeno tipo I, membrana basal reconstituída e alginato (PAMPALONI, STELZER, 2009). Nesse trabalho foi utilizado o gel de alginato, assim maior enfoque será dado a esse tipo de hidrogel.

Alginatos são materiais naturais derivados de algas marinhas e têm sido amplamente utilizados para mimetizar a estrutura da matriz extracelular em culturas celulares em 3D. Possuem propriedades que os tornam extremamente úteis como biomaterial base capaz de fornecer um microambiente favorável às funções e comportamento das células. São solúveis em água à temperatura ambiente e formam géis estáveis por *cross-linking* na presença de certos cátions divalentes como cálcio, bário e estrôncio (SMETANA, 1993), sendo que durante esse processo as células podem ser encapsuladas (LAN et al., 2010).

A Figura 6 mostra várias esferas de alginato contendo condrócitos bovinos utilizados nesse trabalho.



FIGURA 6. Esferas de alginato contendo condrócitos bovinos utilizados no presente trabalho.

Esferoides celulares

Esferoides celulares são grandes agregados de células formados pela aglomeração de células isoladas (KELM et al., 2003, PAMPALONI, STELZER, 2009). A sua formação se dá pelo cultivo de células em uma superfície não aderente, como em cápsulas de alginato em 3D, nas quais as células se aglomeram formando os esferoides, ou em frascos de cultura com rotação, ou através da técnica *hanging-drop*, onde gotas de meio de cultura contendo células isoladas são suspensas na tampa de uma placa de Petri e após 3 a 7 dias de crescimento os esferoides podem ser colhidos. Nas duas últimas técnicas as células se aglomeram através da gravidade (GLICKLIS et al., 2000, KHALIL et al., 2001, KELM et al., 2003, BILODEAU, MANTOVANI, 2006, PAMPALONI, STELZER, 2009).

Muitas linhagens celulares podem agregar em esferoides, incluindo MCF-10a, Caco-2 e HepG2 (KELM et al., 2003).

A diferenciação da cultura em esferoide inclui não somente a conservação da capacidade morfogênica e reorganização histotípica, mas também a manutenção das funções e padrões de expressão gênica (KELM et al., 2003).

Culturas organotípicas

As culturas organotípicas empregam pedaços do órgão a ser estudado, crescido *in vitro* sob condições de cultura de tecido. Culturas organotípicas de pulmão, pele e cérebro têm sido desenvolvidas e são amplamente usadas na descoberta de fármacos e em toxicologia (PAMPALONI, STELZER, 2009).

A principal vantagem de cultivar pedaços de órgãos é que a arquitetura do órgão e a variabilidade interindividual são mantidas. A desvantagem é a necessidade de grande número de biópsias e a dificuldade de padronização dos ensaios (PAMPALONI, STELZER, 2009).

1.5.1.1 Cultura de células em perfusão

Segundo a literatura os três maiores métodos de cultivo de células são: estático (o mais comum), dinâmico (com agitação) e perfusão contínua, sendo que os dois últimos foram introduzidos recentemente e a perfusão contínua considerada o método mais promissor (BURG et al., 2000, BILODEAU, MANTOVANI, 2006).

Em uma cultura em perfusão contínua geralmente são empregados bioreatores. Nesse sistema, as células são suplementadas com o meio de cultura contendo os químicos a serem testados através de uma bomba com um fluxo contínuo e o meio utilizado é coletado, o qual poderá ser usado em ensaios de função metabólica e bioensaios (CUI et al., 2007). Os bioreatores utilizados nesse trabalho, registrados como Tissueflex[®] (Fig 7b), são feitos de polidimetilsiloxano (PDMS). A Figura 7a, tirada desse trabalho, ilustra o esquema de perfusão utilizada.

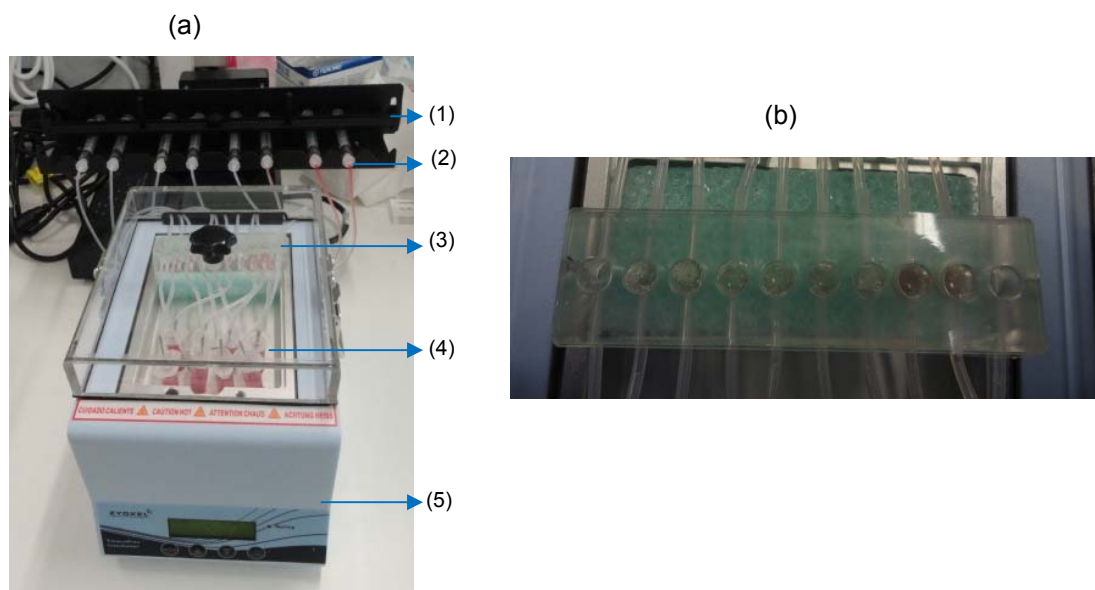


FIGURA 7. (a) Fotografia da perfusão contínua utilizada nesse trabalho: (1) bomba peristáltica, (2) seringas contendo o meio com os químicos a serem testados, (3) bioreator com 10 poços (microbioreatores) contendo células, (4) meio descartado, (5) incubadora. (b) Bioreator Tissueflex[®] com 10 microbioreatores.

Sabe-se que na cultura estática os nutrientes do meio são consumidos e os metabólitos são liberados na mesma solução, o que muda, com o passar do tempo, a composição do meio em contato com as células. Sendo assim, se este não for trocado regularmente, os nutrientes esgotarão e os metabólitos podem atingir níveis indesejados. Além do intenso trabalho e possível risco de contaminação, a principal desvantagem da cultura estática são as variações no ambiente onde se encontram as células, o que pode dificultar a determinação das reais condições da cultura e interpretação dos resultados (CUI et al., 2007).

Na cultura de células em perfusão essas limitações são superadas pelo fornecimento contínuo de nutrientes e substituição do meio dosado com a quantidade desejada do composto a ser testado. Além disso, o meio utilizado é descartado continuamente (SEIDEL et al., 2004).

1.5.2 Células utilizadas

HepG2

Neste trabalho foram utilizadas as células HepG2, isoladas por ADEN et al., em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino de 11 anos. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das

proteínas plasmáticas características das células normais de fígado humano, refletindo de forma satisfatória a biotransformação de pró-mutágenos (KNOWLES et al., 1980). Ainda, essas células mantêm as atividades das enzimas de fase I e II, que estão envolvidas na metabolização de genotóxicos ambientais (UHL, HELMA, KNASMÜLLER, 2000). Além dos fatores acima mencionados, as células HepG2 foram escolhidas porque são derivadas de células humanas e, por isso, têm melhor correlação com possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos para o homem, o que facilita a extrapolação de resultados (KNASMÜLLER et al., 1998).

Condrócitos bovinos

Condrócitos são as células que compõem a cartilagem articular adulta. Estão embebidos em uma abundante matriz extracelular hidratada composta por colágenos (predominantemente tipo II com pequenas quantidades dos tipos VI, IX e XI), proteoglicanas (PGs) e pequenas quantidades de proteínas de matriz não colagenosas (HÄUSELMANN et al., 1994).

Partindo do princípio que o nosso objetivo foi fazer uma avaliação de risco à exposição a esses corantes e não há dados na literatura sobre a ação dos mesmos em cartilagem, escolhemos os condrocitos para esse fim. Além disso, ainda não havíamos estudado a ação desses corantes no metabolismo das células, o que viabilizou o uso dos condrocitos, uma vez que o lactato é o principal metabólito produzido por eles e o ensaio para medir os seus níveis é de fácil execução.

Neste trabalho foram utilizados condrocitos da articulação bovina em cultura primária.

A Figura 8 mostra células HepG2 (a) e condrocitos da articulação bovina (b) dentro de esferas de alginato.

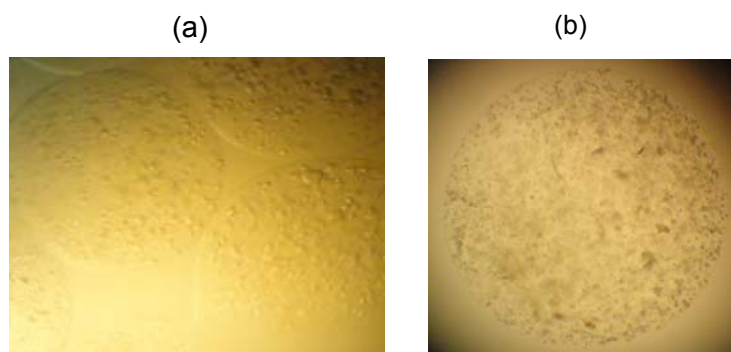


FIGURA 8. Células HepG2 (a) e condrocitos da articulação bovina (b) dentro das esferas de alginato (40x) utilizadas nesse trabalho.

1.6 Avaliação da ecotoxicidade

A ecotoxicidade determina o destino e efeitos de compostos químicos nos organismos que habitam corpos d'água, seu ecossistema e nos homens (PRITCHARD, 1993).

Estudos de toxicidade aguda e crônica em espécies aquáticas não documentam somente a susceptibilidade de espécies individuais a uma variedade de poluentes (MALINS, OSTRANDER, 1991), mas também servem para destacar um número de princípios fundamentais, como bioacumulação dentro de organismos individuais, biomagnificação na cadeia alimentar e a importância das propriedades físicas e químicas de cada agente na determinação da extensão dos dois processos (HAMELINK, SPACIE, 1977).

Há uma área adicional na qual os organismos aquáticos podem ser utilizados com grande relevância: como modelos para definir o mecanismo de ação tóxica de xenobióticos (PRITCHARD, 1993). Adicionalmente, o uso de uma grande variedade de espécies e modelos facilita a determinação de como vários agentes tóxicos, ou grupos de agentes exercem sua toxicidade (LEDERBERG, 1981).

1.6.1 Ensaio de toxicidade aguda utilizando *Daphnia similis*

O gênero *Daphnia* compreende microcústáceos extensivamente usados em testes para avaliar toxicidade aguda e crônica de agentes químicos e efluentes devido a sua alta sensibilidade a um grande número de contaminantes aquáticos. Além disso, sua importância na cadeia alimentar aquática, facilidade de cultivo em laboratório e reprodução partenogenética contribuem para o grande uso desses organismos em ensaios de toxicidade (BURATINI, BERTOLETTI, ZAGATTO, 2004).

Alguns procedimentos padrões utilizando esse gênero como organismo teste para ensaios ecotoxicológicos recomendam espécies temperadas como a *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*. Entretanto, a utilização de outras espécies é possível, desde que sua sensibilidade seja maior ou igual às espécies indicadas. Assim, o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB introduziu outra espécie como um organismo teste, a *Daphnia similis*. Este organismo é fortemente relacionado com a *Daphnia magna*, pertencendo ao mesmo subgrupo do subgênero *Ctenodaphnia* (BURATINI, BERTOLETTI, ZAGATTO, 2004).

Daphnia similis já é recomendado com um organismo teste em ensaios ecotoxicológicos por normas padronizadas no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS [ABNT] 1993). Além disso, Buratini, Bertoletti e Zagatto (2004) fizeram um estudo comparando esta espécie com a *Daphnia magna*, o que confirmou a similaridade de comportamento desses dois organismos. Embora não seja uma espécie nativa, *Daphnia similis* vem sendo muito utilizada em ensaios de toxicidade no Brasil embasando-se nas normas padronizadas pela ABNT (BEATRICI, 2001).

O ensaio de toxicidade aguda empregando *Daphnia similis*, assim como *Daphnia magna*, baseia-se na inibição da capacidade natatória dos organismos. O princípio do método é a exposição de indivíduos jovens por um período de 24 a 48 horas a várias diluições de uma amostra, após o qual é verificado o efeito de perda de mobilidade (ABNT, 1993).

O teste de toxicidade aguda empregando *Daphnia* é recomendado para a avaliação da qualidade de águas naturais onde houve mortandade de peixes e de efluentes líquidos que serão lançados em corpos d'água (ARAGÃO, ARAÚJO, 2006). Além disso, este é um teste mundialmente utilizado e normatizado, o que permite que os resultados possam ser comparados (*Organization for Economic Cooperation and Development* [OECD], 1997).

1.6.2 Ensaio de toxicidade aguda utilizando Microtox[®]

Microtox[®] é um teste de toxicidade aguda baseado na inibição de bioluminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri* NRRL B 11177. É uma marca registrada por Microbics Corporation e hoje é de propriedade da Strategic Diagnostic Inc. (GHIRARDINI et al., 2009).

Vibrio fischeri é uma enterobactéria, Gram negativa, pertencente à família Vibrionaceae, uma grande família consistindo em muitas espécies, que são caracterizadas pela cooperação e interação com tecidos de outros animais. *Vibrio fischeri* tem uma distribuição global, principalmente em águas temperadas e subtropicais onde ocupa uma variedade de nichos (JENNINGS, BRANDES, BIRD, 2001).

Bactérias luminescentes produzem luz quando oxidam simultaneamente riboflavina 5 – fosfato (FMNH₂) e um aldeído de cadeia longa (RCHO) na presença

de oxigênio. Durante a reação a molécula flavina se torna eletronicamente excitada e subsequentemente apresenta fluorescência com o retorno do elétron ao seu estado inicial, o que resulta na emissão de luz. A presença de um composto tóxico no meio altera ou inibe os processos, o que consequentemente reduz a produção de luz pelas bactérias (HARMEL, 2004).

A necessidade de baixa quantidade de amostra, importância ecológica, sensibilidade, reprodutibilidade, padronização e fácil execução fazem do Microtox[®] um teste amplamente aceito no mundo para monitoramento ambiental e atividades de triagem. Ele pode ser usado para testar amostras líquidas e sólidas na avaliação da toxicidade de um composto puro, no monitoramento de água superficial ou efluente, na avaliação de solo, sedimento e extratos orgânicos ou salinos (GHIRARDINI et al., 2009).

Diferentes concentrações de amostra são colocadas em contato com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Se existe uma relação dose-resposta entre as concentrações da solução teste e a luz emitida, então a concentração que reduz a emissão de luz em relação ao controle é reportada. A análise da intensidade de luz é feita automaticamente por um programa de computador (BENNETT, CUBBAGE, 1992).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os corantes originais Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 são genotóxicos para as células HepG2 pelo ensaio do cometa;
- A genotoxicidade dos corantes Disperse Orange 1, Disperse Red 1 e Disperse Red 13 é reduzida após o tratamento por cloração. No caso do corante Disperse Red 13 a genotoxicidade, embora menos intensa, se mantém para todas as concentrações testadas;
- Para todos os corantes, a genotoxicidade é totalmente removida após o tratamento por fotoeletrocatalise;
- Tanto os corantes originais quanto os tratados induzem maior atividade mutagênica com a linhagem YG1041;
- A cloração dos corantes estudados reduz a mutagenicidade apresentada pelos mesmos para a linhagem YG1041;
- Para a linhagem TA98, na qual se observa as menores respostas, a cloração aumenta a mutagenicidade apresentada pelos corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 1 tanto na ausência quanto na presença de S9 e reduz a atividade mutagênica do Disperse Red 13;
- Após a cloração o Disperse Red 13 passa a apresentar atividade mutagênica para a linhagem TA98 na presença de S9;
- O sistema de metabolização S9 reduz a mutagenicidade apresentada tanto pelos corantes originais quanto pelos clorados;
- A fotoeletrocatalise remove a mutagenicidade apresentada pelos corantes originais para o ensaio *Salmonella*/microsoma;
- Somente o corante Disperse Orange 1 induz apoptose pelo ensaio com anexina V e iodeto de propídeo. Essa citotoxicidade é removida por ambos os tratamentos, cloração e fotoeletrocatalise;
- Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 são tóxicos para *Daphnia similis* nas condições testadas. Os tratamentos por cloração e fotoeletrocatalise diminuem a toxicidade apresentada, sendo que a cloração é

mais eficiente na destoxificação do Disperse Red 1 e a fotoeletrocatalise mais eficiente na remoção da toxicidade do Disperse Red 13;

- Somente o corante Disperse Red 1 é tóxico para *Vibrio fischeri* nas condições testadas. Os dois tratamentos diminuem essa toxicidade e a fotoeletrocatalise se mostra mais eficiente;
- Os corantes Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 passam a ser tóxicos para *Vibrio fischeri* após cloração;
- O corante Disperse Red 13 passa a apresentar toxicidade para *Vibrio fischeri* também após a fotoeletrocatalise;
- Os corantes Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 diminuem a atividade mitocondrial dos condrócitos cultivados em monocamadas;
- Dos corantes estudados, somente o Disperse Red 13 diminui a produção de lactato pelos condrócitos nas condições testadas;
- Todos os corantes estudados reduzem a atividade mitocondrial das células HepG2 cultivadas em monocamadas;
- Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 diminuem a atividade mitocondrial das células HepG2 cultivadas em 3D;
- Pode-se obter respostas diferentes em células cultivadas em monocamadas e em 3D, como foi o caso do corante Disperse Orange 1 na atividade mitocondrial das células HepG;
- Dos corantes estudados somente o Disperse Red 13 diminui a atividade de desidrogenases das células HepG2 e tal efeito é observado tanto no cultivo em monocamadas quanto em 3D;
- Baseado nos experimentos realizados nesse trabalho, o corante Disperse Red 13 é o mais tóxico para condrócitos e células HepG2;
- Embora seja um método promissor, atenção deve ser dada na avaliação e aplicação da fotoeletrocatalise como um método alternativo à cloração.

Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATON, I.A.; TURELI, G.; HANCI, T.O. Treatment of azo dye production wastewaters using Photo-Fenton-like advanced oxidation processes: Optimization by response surface methodology. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.202, p.142–153, 2009.

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

AN, Y.; JIANG, L.; CAO, J.; GENG, C.; ZHONG, L. Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells. **Mutation Research**, v.627, p.164–170, 2007.

ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v.53, p. 51-59, 1999.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. **Métodos de ensaio e toxicidade com organismos aquáticos**. Em: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, p.117-152.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS [ABNT] (1993). Água. Ensaio de toxicidade com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea. NBR 12713, Rio de Janeiro, Brasil.

AZUR ENVIRONMENTAL, 1998. Microtox manual. Disponível em < www.azurenv.com > acesso em 12 de junho de 2010.

BAE, J.S.; FREEMAN, H.S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, v.73, p.81-85, 2007.

BANERJEE, P.; TALAPATRA, S.N.; MANDAL, N.; SUNDARAM, G.; MUKHOPADHYAY, A.; CHATTOPADHYAY, D.; BANERJEE, S. Genotoxicity study with special reference to DNA damage by comet assay in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* exposed to drinking water. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.402–407, 2008.

BARROS, A.L.; PIZZOLATO, T.M.; CARISSIMI, E.; SCHNEIDER, I.A.H. Decolorizing dye wastewater from the agate industry with Fenton oxidation process. **Minerals Engineering**. v. 19, p.87–90, 2006.

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

BAYO, J.; ANGOSTO, J.M.; LOPEZ, M.D.G. Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by *Vibrio fischeri* bioassay after a chlorination–dechlorination process. **Journal of Hazardous Materials**, *in press*, 2009.

BEATRICI, A.C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas**. UFRS, 2001. 18 páginas. Dissertação (bacharelado) Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BENNETT, J.; CUBBAGE, J. Review and Evaluation of Microtox[®] Test for Freshwater Sediments. Washington State Department of Ecology Environmental, Investigations and Laboratory Services Program. Toxics, Compliance, and Ground Water Investigations Section. Olympia, Washington., 1992.

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

BILODEAU, K.; MANTOVANI, D. Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. **Tissue Engineering**, v.12, p.2367-2383, 2006.

BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHI, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDE, M.; POLI, P.; ROSSI, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of the Total Environment**, v.333, p.127– 136, 2004.

BOUBRIAK, O.A.; URBAN, J.P.G; CUI, Z.F. Monitoring of lactate and glucose levels in engineered cartilage construct by microdialysis. **Journal of Membrane Science**, v.273, p.77–83, 2006.

BOUBRIAK, O.A.; J.T.S., BROOKS, J.P.G., URBAN. Cytochrome c oxidase levels in chondrocytes during monolayer expansion and after return to three dimensional culture. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.7, p.1084 -1092, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 518/GM, 25 de março de 2004. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2004 mar, seção 1, p.266-270.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Classifica as águas do Território Nacional. Resolução n. 357, 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2005 mar 18:58-63.

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

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, p.878 – 882, 2004.

BURG, K.J.L.; HOLDER, W.D.; CULBERSON, C.R.; BEILER, R.J.; GREENE, K.G.; LOEBSACK, A.B.; ROLAND, W.D.; EISELT, P.; MOONEY, D.J.; HALBERSTADT, C.R. Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. **Biomedical Materials Research**, v.51, p.642-649, 2000.

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.

CARNEIRO, P.A, OSUGI, M.E., FUGIVARA, C.S., BORALLE, N., FURLAN, M., ZANONI, M.V.B. Evaluation of different electrochemical methods on the oxidation and degradation of Reactive Blue 4 in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 59, p.431–439, 2005.

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

CHATURVEDI, V.; SREEDHAR, A.S. Hsp90 inhibition induces destabilization of actin cytoskeleton in tumor cells: functional significance of Hsp90 interaction with F-actin. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.715-722, 2010.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. USP, 2008. 120 páginas. Dissertação (mestrado). Programa de pós graduação em Toxicologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

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

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

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.

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

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principle, Applications and Limitations. *Molecular Biotechnology*, v.26, p.249-261, 2004.

COLLINS, A.R; AI-GUO; M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336 p.69-77, 1995.

COMPANHIA DE SANEAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO [SABESP]. Disponível em <http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=2&temp2=3&proj=sabesp&pub=T&nome=Uso_Racional_Agua_Generico&db=&docid=0559F0B0B4127513832570D1006527A2> acesso em 10/05/2009.

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

CUI, Z.F.; XU, X.; TRAINOR, N.; TRIFFITT, J.T.; URBAN, J.P.G.; TIRLAPUR, U.K. Application of multiple parallel perfused microbioreactors and three-dimensional stem cell culture for toxicity testing. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1318-1324, 2007.

DHIMAN, H.K., RAY, A.R., PANDA, A.K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, v.26, p.979–986, 2005.

DOJINDO. Cell Counting Kit-8, 2010. Technical Manual. Disponível em <www.dojindo.com> Acesso em 03 de janeiro de 2010.

DURAND, R. E.; BROWN, S. M. Effects of lucanthone on chinese hamster V-79 cells I. Interaction with radiation in monolayers and spheroids. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v.6, p.1525-1530, 1980.

ELKAYAM, T.; AMITAY-SHAPRUT, S.; DVIR-GINZBERG, M; HAREL, T.; COHEN, S. Enhancing the drug metabolism activities of C3A - a human hepatocyte cell line – by tissue engineering within alginate scaffolds. **Tissue Engineering**, v.12, p.1357-1368, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**, v.35, p.495 – 516, 2007.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Research**, v. 57, p.1835–1840, 1997.

EKWALL, B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. **Annals of the New York Of Science**, v.407, p.64-77, 1983.

ECOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ASSOCIATION OF DYES AND ORGANIC PIGMENTS MANUFACTURERS [ETAD]. Information on the 19th Amendment of the Restrictions on the Marketing and Use of certain azocolourants (Directive 2002/61/EC of the EP and of the EC of 19 July 2002). Disponível em:<<http://www.etad.com/information/information.php>>. Acesso em 28 dez. 2008.

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**, in press, 2010.

FERRAZ, E.R.A; GRANDO, M.D.; OLIVEIRA, D.P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in Daphnia similis and Vibrio fischeri. **Journal of Hazardous Materials**, v.192, p.628–633, 2011.

FRAGA, L.E.; ANDERSON, M.A.; BEATRIZ, M.L.P.M.A.; PASCHOAL, F.M.M.; ROMÃO, L.P.; ZANONI, M.V.B. Evaluation of the photoelectrocatalytic method for oxidizing chloride and simultaneous removal of microcystin toxins in surface waters. **Electrochimica Acta**, v.54, p.2069–2076, 2009.

FRANCE, B.F.; CARTER, M.H.; JOSEPHY, P.D. Comparative metabolism and mutagenicity of azo and hydrazone dyes in the Ames test. **Food and Chemical Toxicology** v. 24, p. 165-169, 1986.

FUKUNAGA, M. T., **Estudo da Degradação de Efluentes Aquosos Derivados da Indústria Produtora de Fenol Através de Eletrólise Foto-Assistida**, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 104 p. Tese (Doutorado).

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

GARLE, M.J.; FENTEM, J.H.; FRY, J.R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicology in Vitro**, v.8, p.1303-1312, 1994.

GHIRARDINI, A.V.; GIRARDINI, M.; MARCHETTO, D.; PANTANI, C. Microtox[®] solid phase test: Effect of diluent used in toxicity test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p.851–861, 2009.

GLICKLIS, R.; SHAPIRO, L.; AGBARIA, L.; MERCHUK, J.C.; COHEN, S. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, p.344-353, 2000.

GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS (GHS), 2005. Part 3. Health and Environmental Hazards. United Nations.

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

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canos: Ulbra, 2003. p.173-200.

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

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

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

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

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

HAMELINK, J. L.; SPACIE, A. Fish and chemicals: the process of accumulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.17, p.167-177, 1977.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman – Karber for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays, *Environmental Science Technology*, v.11, p.714 – 719, 1977.

HARMEL, V.C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais** Universidade Regional de Blumenau, 2004. 100 páginas. Tese (mestrado). Programa de pós graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2004.

HAO, O.J.; KIM, H.; CHIANG, P. Decolorization of Wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.30, p.449–505, 2000.

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

HÄUSELMANN, H.J.; FERNANDES, R.J.; MOK, S.S.; SCHMID, T.M.; BLOCK, J.A.; AYDELOTTE, M.B.; KUETTNER, K.E.; THONAR, E.J.M.A. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. **Journal of Cell Science**, v.107, p.17-27, 1994.

HEWITT, N.J., LECHON, M.J., HOUSTON, J.B., HALLIFAX, D., BROWN, H.S., MAUREL, P., KENNA, J.G., GUSTAVSSON, L., LOHMANN, C., SKONBERG, C., GUILLOUZO, A., TUSCHL, G., LI, A.P., LECLUYSE, E., GROOTHUIS, G.M.M., HENGSTLER, J.G. Primary hepatocytes: Current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. **Drug Metabolism Review**, v.39, p.159–234, 2007.

HOFFMAN, R.M. Three-dimensional sponge-gel matrix histoculture: methods and applications. **Cell Biology: A Laboratory Handbook**, p.367-379, 1994.

HOFFMAN, R.M. Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research. **Cancer Cells**, v.3, p.86–92, 1991.

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

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

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Apoptosis – Signals and Diseases. **Biochemica**, n.3, p.24 – 27, 1999.

INCH, W.R.; MCCREDIE, J.A.; SUTHERLAND, R.M. Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. **Growth**, v. 34, p. 271-282, 1970.

JAGER, 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.

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

JENNINGS, V.L.K.; BRANDES, M.H.R.; BIRD, D. Assessing chemical with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. **Chemosphere**, v.102, p.109, 2001.

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

KELM, J.M.; TIMMINS, N.E.; BROWN, C.J.; FUSSENEGGER, M.; NIELSEN, L.K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology and Bioengineering**, v.83, p.173-180, 2003

KHALIL, M.; PANAH, A.S.; TOOTLE, R.; RYDER, T.; MCCLOSKEY, P.; ROBERTS, E.; HODGSON, H.; SELDEN, C. Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. **Journal of Hepatology**, v.297, p.68-77, 2001.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, 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.

KOIVUSALO, M.K.; PUKKALA, E.; VARTIAINEN, T.; JAAKKOLA, J.J.K.; HAKULINEN, T. Drinking water chlorination and cancer – a historical cohort study in Finland. **Cancer Causes and Control**, v.8, p.192-200, 1997.

KONSTANTINOPOULOS, 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.

KNOWLES, B.B.; HOWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, p.497–499, 1980.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L.M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.110, n.1-2, p.13-24, 1999.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia Biologica**, v.45, n.3-4, p.153-156, 1997.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v.44, p.205–221, 2008.

KUMMROW, F.; UMBUZEIRO, G.A. 2-fenilbenzotriazolóis (PBTA): uma nova classe de contaminantes ambientais. **Química Nova**, v.31, p.401-406, 2008.

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

LAN, S.F.; MROCZKA, B.S.; STARLY, B. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: a study of cell viability, morphology and drug metabolism. **Toxicology in Vitro**, v.24, p.1314-1323, 2010.

LEDERBERG, J. A challenge for toxicologists. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.1, p.110-112, 1981.

LEE, R.B.; URBAN, J.P. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. **Biochemical. J.**, v.321(Pt 1), p.95-102, 1997.

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

LI, G.; AN, T.; NIE, X.; SHENG, G.; ZENG, X.; FU, J.; LIN, Z.; ZENG, E.Y. Mutagenicity assessment of produced water during photoelectrocatalytic degradation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.26, p.416-423, 2007.

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

LOWE, S.W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, London, v.21, p.485-495, 2000.

LU, N.; CHEN, S.; WANG, H.; QUAN, X.; ZHAO, H. Synthesis of molecular imprinted polymer modified TiO₂ nanotube array electrode and their photoelectrocatalytic activity. **Journal of Solid State Chemistry**, v.181, p.2852-2858, 2008.

MACEDO, L.C.; ZAIA, D.A.M.; MOORE, G.J.; SANTANA, H. Degradation of leather dye on TiO₂: A study of applied experimental parameters on photoelectrocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.185, p.86-93, 2007.

MALINS, D.C. Perspectives in aquatic toxicology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.31, p.371-399, 1991.

MARABINI, L.; FRIGERIO, S.; CHIESARA, E.; MAFFEI, F.; FORTI, G.C.; HRELIA, P.; BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C.; RADICE, S. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of chlorinated drinking waters sampled along the distribution system of two municipal networks. **Mutation Research**, v.634, p.1-13, 2007.

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

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

MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? **Genes & Nutrition**, v.4, p.13-22, 2009.

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

MEIJER, A.J; CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.2445–2462, 2004.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.399, n.2, p.135-147, 1998.

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

MOSCONA, A. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 43, p. 184-194, 1957.

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

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

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

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

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD] Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the final ring test of the Daphnia magna reproduction test organization. General Distribution OCDE/GD, v.19, p. 1-190, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guideline for testing of Chemicals, n°202, Adopted:13/04/2004

ORIVE, G.; HERNANDEZ, R.M.; GASCON, A.R.; IGARTUA, M.; PEDRAZ, J.L. Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p.23–30, 2003.

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

OSUGI, M.E.; RAJESHWAR, K.; FERRAZ, E.R.A.; OLIVEIRA, D.P.; ARAUJO, A.R.; ZANONI, M.V.B. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photoelectrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. **Electrochimica Acta**, v.54,p.2086–2093, 2009.

OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A.; ANDERSON, M.A.; ZANONI, M.V.B. Degradation of metallophthalocyanine dye by combined processes of electrochemistry and photoelectrochemistry. **Electrochimica Acta**. v.50, p.5261-5269, 2005.

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.

OTHMER, K. Encyclopedia of Chemical Technology. V.8, 4ed. Estados Unidos, 1993.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E.G.; STELZER, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.839-845, 2007.

PAMPALONI, F.; STELZER, E.H.K. Three-dimensional cell cultures in toxicology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.26, p.129-150, 2009.

PARK, J.H.; LEE, B.J; LEE, S.K; KIM, K.; LEE, K.H.; CHE, J.H.; KANG, K.S.; LEE, Y.S. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. **Mutation Research**, v.466-2000, p.173–178, 2000.

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

PHILLIPS, J.C.; GIBSON, W.B.; YAM, J.; Alden, C.L.; Harg, G. Survey of the QSAR and *in vitro* approaches for developing non-animal methods to supersede the *in vivo* LD50 test. **Food and Chemical Toxicology**, v.28, p.375-394, 1990.

PIRET, J.P.; ARNOULD, T.; FUKS, B.; CHATELAIN, P.; REMACLE, J.; MICHIELIS, C. Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v.67, p.611-620, 2004.

PIZZOLATO, T.M.; CARISSIMI, E.; MACHADO, E.L.; SCHNEIDER, I.A.H. Colour removal with NaClO of dye wastewater from an agate-processing plant in Rio Grande do Sul, Brazil. **International Journal Mineral Processing**, v.65, p.203– 211, 2002.

PRITCHARD, J.B. Aquatic Toxicology: Past, Present, and Prospects. **Environmental Health Perspectives**, v.100, p.249-257, 1993.

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

RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; DEMARINI, D.M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research, **Mutation Research**, v.636, p.178–242, 2007.

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.

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v.722, p.25-254, 1999.

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

SARASA, J.; ROCHE, M.P.; ORMAD, M.P.; GIMENO, E.; PUIG, A.; OVELLEIRO, J.L. Treatment of a wastewater resulting from dyes manufacturing with ozone and chemical coagulation. **Water Research**, v.32, p.2721-2727, 1998.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, v.393, n.1-2, p.133-139, 1997.

SCHAFER, H.; SCHAFER, A.; KIDERLEN, A.F.; MASIHI, K.N.; BURGER, R. A highly sensitive cytotoxicity assay based on the release of reporter enzymes, from stably transfected cell lines. **Journal of Immunological Methods**, v.204, p.89-98, 1997.

SEIDEL, J.O., PEI, M., GRAY, M.L., LANGER, R., FREED, L.E., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Long-term culture of tissue engineered cartilage in a perfused chamber with mechanical stimulation. **Biorheology**, v.41, p.445-458, 2004.

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. 1117-1119, 1991.

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

SHIOZAWA, T.; SUYAMA, K.; NAKANO, K.; NUKAYA, H.; SAWANISHI, H. OGURI, A.; WAKABAYASHI, K.; TERAQ, Y. Mutagenic activity of 2 phenylbenzotriazole derivatives related to a mutagen, PBTA-1, in river water. **Mutation Research**. v. 442, p.105-111, 1999.

SEIBERT, H.; BALLS, M.; FENTEM, J.H.; BIANCHI, V.; CLOTHIER, H.; DIERICKX, P.J.; EKWALL, B.; GARLE, M.J.; LECHÓN, M.J.G.; GRIBALDO, L.; GÜLDEN, M.; LIEBSCH, M.; RASMUSSEN, E.; ROGUET, R.; SHRIVASTAVA, R.; WALUM, E. acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. **ATLA**, v.24, p. 499-510, 1996.

SLOKAR, Y.M.; MARECHAL, A.M.L. Methods of Decoloration of Textile Wastewaters. **Dyes and Pigments**, v.37, p.335-356, 1998

SMETANA, K. Cell biology of hydrogels. **Biomaterials**, v.14, p.1046-1050, 1993.

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

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

STEEG ,P.S.; ALLEY, M.C.; GREVER, M.R. An added dimension: will three-dimensional cultures improve our understanding of drug resistance? **Journal of the National Cancer Institute**, v.86, p.953-955, 1994.

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

STRICKER, J.; FALZONE, T.; GARDEL, M.L. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. **Journal of Biomechanics**, v.43, p.9–14, 2010.

SUN, T.; JACKSON, S.; HAYCOCK, J.W.; MACNEIL, S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, v.122, p.372–381, 2006.

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

SZPYRKOWICZ, L.; JUZZOLINO, C.; KAUL, S.N. A comparative study on oxidation of disperse dyes by electrochemical process, ozone, hypochlorite and fenton reagent. *Wat. Res.* VOL. 35, NO. 9, PP. 2129–2136, 2001.

TAUCHERT, E.; ZAMORA, P.P. Avaliação de processos fotoeletroquímicos no tratamento de líquidos lixiviados de aterros sanitários. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.9, p.197-201, 2004.

TENNANT, J.R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. **Transplantation**, v.2, issue 6, p. 685-815, 1964.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.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.

TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; MADARAME, H.; UENO, S.; SUSA, N.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, N.; SEKIHASHI, K.; SASAKI, Y.F. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mutation Research**, v.465, p.11–26, 2000.

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

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, 2005a.

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

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECH, C.M.; SATO, M.I.Z.; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, v. 54, p. 1589-1597, 2004.

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

UMBUZEIRO, G.A.; WARREN, S.; CLAXTON, L.D. The mutation spectra of chlorinated drinking water samples using the base-specific TA7000 strains of *Salmonella* in the microsuspension assay. **Mutation Research**, v.609, p.26–33, 2006.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELLINGSBERGER, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v.184, p.39-51, 1995.

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

WANG, L.S.; WEI, D.B.; WEI, J.; HU, H.Y. Screening and estimating of toxicity formation with photobacterium bioassay during chlorine disinfection of wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v.141, p.289–294, 2007.

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

WYLLIE, A.H. Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**, v.53, p.451–465, 1997.

ZANI, C.; FERETTI, D.; BUSCHINI, A.; POLI, P.; ROSSI, C; GUZZELA, L.; CATERINO, F.D.; MONARCAS. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. **Mutation Research**, v.587, p.26–37, 2005.

ZANONI, M.V.B.; SENE, J.J.; ANDERSON, M.A. Photoelectrocatalytic degradation of Remazol Brilliant Orange 3R on titanium dioxide thin-film electrodes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.157, p.55–63, 2003.

ZIOLLI, R.L.; JARDIM, W.F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO₂. **Química Nova**. v.21, p.319-325, 1998.

Foto da capa disponível em <<http://www.flickr.com/photos/cokada/553634989/>> acesso em 17 de outubro de 2011.