

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da capacidade de dano ao material genético pelos azo
corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1:
identificação e análise do potencial mutagênico dos seus produtos
de biotransformação**

Farah Maria Drumond Chequer

Ribeirão Preto
2011

RESUMO

CHEQUER, F.M.D. **Avaliação da capacidade de dano ao material genético pelos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1: identificação e análise do potencial mutagênico dos seus produtos de biotransformação.** 2011. 190 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Atualmente, a utilização de azo corantes por vários ramos industriais constitui um problema ambiental e de saúde pública, tendo em vista o lançamento de quantidades elevadas para o meio ambiente e a falta de dados toxicológicos a cerca dos corantes e de seus metabólitos gerados, principalmente, após os processos de oxidação e redução. Nosso grupo realizou ensaios com micronúcleos em linfócitos humanos e em células HepG2 e ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, demonstrando que os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 são mutagênicos para os diferentes parâmetros. Dessa forma, neste trabalho foi avaliada a capacidade de ligação dos corantes originais com o DNA e a base nitrogenada guanosina, a fim de elucidar o mecanismo de ação mutagênica. Adicionalmente, foi realizada a análise do potencial mutagênico do corante Disperse Red 1 e de seus metabólitos por meio do teste de mutação gênica em células de linfomas de camundongo (*Mouse Lymphoma Assay*), e também foram avaliados os produtos de oxidação e redução dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, por meio do teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*. Posteriormente, foi investigada a possível formação de aminas aromáticas e de outros compostos, após os ensaios eletroquímicos e reação com S9, utilizando CLAE/DAD e CG/EM. Nossos resultados mostraram que a formação de adutos com o DNA, especificamente com a base guanosina, não é o mecanismo de ação tóxica preferencial para os azo corantes estudados. O corante Disperse Red 1 e seus produtos de biotransformação apresentaram resultados negativos no teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongos. No entanto, tanto os produtos de oxidação como os de redução dos três corantes estudados apresentaram potencial mutagênico ao serem testados no Ensaio *Salmonella*/microssoma. Os produtos identificados após a oxidação química e enzimática (utilizando S9) e redução química dos três corantes estudados foram: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, 2-cloro-4-nitro-benzamina, benzamina, nitrobenzeno, 4-nitro-benzamina, 2-(etilfenilamino)-etanol, N-fenil-benzamina, N-fenil-1,4-benzenodiamina. Portanto, nossos dados mostram que a exposição por via oral a esses corantes tem relevância toxicológica, visto que podem causar danos à saúde não somente pela exposição aos corantes inalterados, mas também devido à formação de produtos tóxicos após a biotransformação. Cabe ressaltar que os corantes estudados no presente trabalho são amplamente utilizados por indústrias têxteis no Brasil, o que pode levar à contaminação de águas e alimentos.

Palavras-chave: Disperse Red 1. Disperse Red 13. Disperse Orange 1. Oxidação. Redução. Aminas aromáticas. Mutagenicidade.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Há mais de 20 mil anos, o homem utiliza as cores, sendo que o Negro-de-Fumo (*Carbon Black*) foi o primeiro corante de que se tem conhecimento. Com o tempo, muitos corantes naturais foram sendo descobertos e eram utilizados não somente por motivos estéticos, mas também como símbolo de honra e prestígio. Na Roma Antiga, a cor púrpura, obtida de um molusco marinho chamado Murex, era símbolo de riqueza e distinção, e, portanto, utilizada nas vestes reais. Outro corante muito utilizado era o índigo, extraído da planta *Isatis tinctoria*, conhecido desde os egípcios até os bretões (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA [ABIQUIM], 2006).

Por volta de 3.000 a.C., surgiram alguns corantes inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio. Em 1856, William H. Perkin sintetizou o primeiro corante orgânico, conhecido como Mauve, por meio da oxidação da fenilamina (anilina) com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (ABIQUIM, 2006). A partir desta época, milhares de corantes orgânicos têm sido sintetizados, visando atender às exigências do mercado consumidor em relação à estabilidade das cores nas fibras. Além disso, juntamente com o crescimento da indústria têxtil em todo o mundo, ocorreu um aumento proporcional no uso destes compostos, e isto tem sido acompanhado por um aumento da poluição, devido aos efluentes contaminados com essas substâncias (PANDEY et al., 2007; SARATELE et al., 2011).

Os corantes sintéticos são usados extensivamente nas indústrias têxteis, farmacêuticas e alimentícias; na impressão de papel e fotografia; e produtos a base de petróleo (COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997; RAJAGURU et al., 1999). Estima-se que aproximadamente 10^9 kg de corantes são produzidos anualmente no mundo, sendo que os dois grupos mais utilizados na coloração de diferentes grupos têxteis são azo e antraquinona (KRIŽANEC; MARECHAL, 2006; FORSS; WELANDER, 2011). Do montante destes corantes, 10 a 15 % são descartados no meio ambiente, devido à relativa baixa fixação destes compostos nas fibras (RAJAGURU et al., 1999; NAM; RENGANATHAN, 2000), tornando esta classe um problema ambiental bastante preocupante.

Em 1974, após a formação da *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry* (ETAD), foram estabelecidos objetivos para minimizar os danos ambientais, proteger os consumidores e cooperar plenamente com as preocupações do governo e do público sobre o impacto toxicológico dos

seus produtos (ANLIKER, 1979; ROBINSON et al., 2001). Dentro desse contexto, a ETDA avaliou 4.000 corantes, e destes mais de 90% apresentaram valores DL_{50} superiores a 2×10^3 mg/kg, sendo que as maiores taxas de toxicidade foram encontradas entre os corantes básicos e diazo diretos (ROBINSON et al., 2001). Desta forma, foi demonstrada que a toxicidade aguda destes xenobióticos não é relevante. Porém, o grande interesse da Toxicologia por estes compostos se deve às exposições crônicas a baixas concentrações. A exposição a alguns azo corantes tem sido relacionada ao desenvolvimento de câncer de bexiga em humanos, sarcomas esplênicos, hepatocarcinomas e anomalias nucleares em animais experimentais e aberrações cromossômicas em células de mamíferos (PERCY; MOORE; CHIPMAN, 1989; MANSOUR et al., 2007).

O extenso uso dos azo corantes está relacionado ao grau de industrialização da sociedade. Assim, desde a década de 70, observou-se que a incidência de câncer intestinal era mais comum nas sociedades altamente industrializadas, e, conseqüentemente, poderia existir uma conexão entre o aumento do número de casos de câncer e o uso dos azo corantes (CHUNG; FULK; ANDREWS, 1978). Dessa maneira, os corantes passaram a ser considerados não só um problema ambiental, mas também de saúde pública.

A preocupação ambiental com a presença dos corantes em corpos d' água, principalmente aqueles que serão utilizados para captação e produção de água tratada para consumo humano, reside no fato de que as populações podem se expor por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. Como será apresentado mais adiante neste trabalho, após a ingestão, esses compostos podem ser metabolizados gerando produtos tóxicos, principalmente aqueles que contêm o grupo azo como cromóforo, que após a clivagem podem gerar aminas aromáticas mutagênicas e/ou carcinogênicas (VENTURINE; TAMARO, 1979; PRIVAL; MITCHELL, 1982; FREEMAN; ESANCY; CLAXTON, 1990).

A absorção de azo corantes também pode acontecer após a exposição da pele em ambientes ocupacionais ou durante a utilização de cosméticos. Nos anos 80, a absorção percutânea desses corantes por meio da maquiagem facial foi considerada como um fator de risco de incapacidades reprodutivas e aberrações cromossômicas em uma população de locutores de televisão empregados no Centro de Televisão de Praga, na República Tcheca (KUČEROVÁ et al., 1987; COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993).

Assim, é importante conhecer não somente a toxicidade dos corantes originais, mas também de seus produtos de metabolismo, considerando que o tratamento convencional aplicado pelas Estações de Tratamento de Águas não são capazes de remover grande parte desses compostos e, conseqüentemente, podem ser encontrados na água tratada (OLIVEIRA et al., 2007).

1.1 Azo Corantes e seus efeitos mutagênicos

Os azo corantes consistem em uma amina diazotada acoplada a outra amina ou a um fenol, e esta classe é caracterizada pela presença de um ou mais grupamentos azo (N=N) (BAE; FREEMAN, 2007; KUSIC et al., 2011). Estes corantes são largamente utilizados por diversos ramos industriais e na década de 80 correspondiam a aproximadamente 70% dos corantes utilizados mundialmente por peso (ZOLLINGER, 1987).

Os azo compostos são considerados a classe química mais importante para a indústria de tingimento, principalmente de náilon e poliéster, por serem economicamente mais viáveis do que as demais e por exibirem a maior variedade de cores (BAE; FREEMAN, 2007; KUSIC et al., 2011; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997; GUARATINI; ZANONI, 2000). Além da aplicação na indústria têxtil, essa classe de corantes é bastante utilizada pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos, bem como na impressão e fabricação de papel (CHUNG; STEVENS, 1993; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997; CHANG et al., 2001).

Os azo corantes exibem grande variedade de cores e representam mais do que 50% de todos os corantes produzidos anualmente (CARLIELL et al., 1995; BAE; FREEMAN, 2007; KUSIC et al., 2011). Apresentam boa fixação às fibras, em comparação com outros corantes sintéticos, porém, esta fixação é de no máximo 85%. Este fato explica a grande quantidade de corantes perdidos para o meio ambiente (10 a 15%) (RAJAGURU et al., 1999; NAM; RENGANATHAN, 2000), anteriormente citada. Assim, estima-se que 280.000 toneladas de corantes têxteis são descartadas pelos efluentes industriais (MAAS, CHAUDHARI, 2005; JIN et al., 2007; SARATELE et al., 2011). Além disso, boa parte dos representantes desta classe resiste aos tratamentos convencionais tanto de efluentes industriais como de água tratada (UMBUZEIRO et al., 2005a). Um estudo conduzido por Shaul et al. (1991) mostrou que dos 18 azo corantes estudados, 11 passaram através do

processo de Lodo Ativado praticamente inalterados, 4 foram adsorvidos no lodo e somente 3 foram biodegradados, acarretando o lançamento destas substâncias em corpos d'água. Oliveira e colaboradores (2007) mostraram que o efluente tratado de uma indústria de tingimento era mutagênico e continha diversos tipos de corantes. Esses dados são preocupantes considerando que o efluente desta mesma indústria foi estudado por Lima et al. (2007), que observaram que ratos Wistar expostos a esta amostra apresentaram aumento na incidência de criptas aberrantes no cólon, que é um biomarcador precoce de carcinogenicidade.

Muitos corantes do tipo azo têm mostrado resultados positivos em diferentes parâmetros. Tsuboy et al. (2007), analisaram os efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos do azo corante CI Disperse Blue 291 e os resultados obtidos mostraram claramente que esse azo corante causou efeitos dose-dependentes, induzindo à formação de micronúcleos (MNs), fragmentação de DNA e aumento do índice apoptótico em células de hepatoma humano (HepG₂).

Vários azo corantes mostraram respostas positivas para mutagenicidade em ensaios com *Salmonella* e em testes com mamíferos, e seus potenciais dependem da natureza e da posição dos substituintes em relação tanto aos anéis aromáticos como ao átomo de nitrogênio do grupo amino. Por exemplo, 3-metoxi-4-aminoazobenzeno é um potente hepatocarcinógeno em ratos e forte mutágeno em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, enquanto que 2-metoxi-4-aminoazobenzeno é aparentemente não carcinogênico e um mutágeno extremamente fraco sob condições similares (HASHIMOTO; WATANABE; DEGAWA, 1977; ESANCY; FREEMAN; CLAXTON, 1990; GARG; BHAT; BOCK, 2002; FERRAZ et al., 2010). Ademais, Ferraz et al. (2010) estudou a mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 por meio do Teste de Ames, e perceberam que o substituinte Cl no corante Disperse Red 13 diminuiu a mutagenicidade deste 32 vezes com a linhagem TA98 e 14 vezes com a linhagem YG1041, quando comparado com o corante Disperse Red 1 (FERRAZ et al., 2010). Adicionalmente, os corantes Acid Red 18 e Acid Red 17 são não mutagênicos, enquanto que o corante estruturalmente similar Acid Red 26 é reportado como carcinogênico somente devido à incorporação de um grupo metil e à alteração da posição do sulfonato de sódio (FREEMAN; ESANCY; CLAXTON, 1990).

Chung e Cerniglia (1992) fizeram uma revisão sobre vários corantes azoicos já avaliados pelo ensaio *Salmonella*/microssoma. De acordo com esta revisão, todos

os azo corantes avaliados contendo o grupamento nitro apresentaram atividade mutagênica. Os corantes Acid Alizarin Yellow R e Acid Alizarin GG apresentaram este efeito na ausência de ativação metabólica (BROWN; ROEHM; BROWN, 1978). Já os corantes C.I. Basic Red 18 e Orasol Navy 2RB foram mutagênicos tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica (VENTURINI; TAMARO, 1979; NESTMANN; KOWBEL; WHEAT, 1981).

Al-Sabti (2000) demonstrou que o corante têxtil azo reativo Clorotriazina Red 120 (CRARD-120) apresentou atividade mutagênica no ensaio de indução de MNs em eritrócitos de carpa prussiana (*Carassius auratus gibelio*). Além disso, apresentou atividade clastogênica, o que é um potente fator de risco no desenvolvimento de doenças genéticas, teratogênicas ou carcinogênicas de populações de peixes. Conseqüentemente, efeitos desastrosos podem ser provocados no ecossistema aquático, já que o destino desses compostos são os efluentes despejados em recursos hídricos (AL-SABTI, 2000).

Outro estudo demonstrou a clastogenicidade *in vivo* do azo corante Direct Red 2 (DR2) no teste de micronúcleo em medula óssea de rato, e ainda levantou dados para discutir a cerca do seu potencial carcinogênico humano, tanto na forma inalterada quanto na forma de metabólitos. Além dos efeitos relacionados à exposição por meio de águas e alimentos contaminados, a exposição a estes compostos também se estende às pessoas que lidam com esse produto no ambiente de trabalho por meio da absorção dérmica do corante (RAJAGURU et al., 1999). Assim, pode-se inferir que não só os corantes originais são potencialmente tóxicos, mas também seus produtos de biotransformação devem ser avaliados.

1.2 A formação dos metabólitos oriundos dos azo corantes e os seus efeitos

Os primeiros estudos sobre o metabolismo dos compostos azoicos em mamíferos foram realizados por Sisley e Porscher em 1911. Esses pesquisadores identificaram o ácido sulfanílico na urina de cães alimentados com o corante Orange I e demonstraram, pela primeira vez, que os azo compostos poderiam ser metabolizados pela clivagem redutiva do grupo azo (SISLEY; PORSCHER, 1911¹ apud WALKER, 1970, p. 659).

¹ Sisley, P.; Porscher, C. Du sort des matières colorantes darts l'organisme animal. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, Paris, v. 152, p. 1062, 1911

Os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e tóxicos de azo corantes podem decorrer da ação direta do próprio agente ou da formação de radicais livres e derivados aril aminas, gerados durante a biotransformação redutiva da ligação azo (CHUNG; STEVENS; CERNIGLIA, 1992; COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993; RAJAGURU et al., 1999) ou de produtos obtidos após a oxidação via citocromo P450 (FUJITA; PEISACH, 1978; ARLT et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005b).

Conseqüentemente, um dos critérios para classificar um corante como prejudicial ao ser humano é a sua habilidade em clivar redutivamente formando aminas aromáticas em contato com o suor, saliva ou suco gástrico (PIELESZ, 1999, 2002). Algumas dessas aminas aromáticas são carcinogênicas e são capazes de acumular em cadeias alimentares, como por exemplo, as bifenilaminas, tais como benzidinas e 4-bifenilaminas, que estão presentes no meio ambiente e, portanto, constituem uma ameaça à saúde humana e aos ecossistemas em geral (CHOUHDARY, 1996; CHUNG; HUGLES; CLAXTON, 2000). A Benzidina, uma amina aromática gerada após a biotransformação de vários corantes do tipo azo, é conhecida por causar câncer de bexiga em humanos e roedores e é carcinogênica para alguns tecidos, incluindo o fígado e o intestino (PERCY; MOORE; CHIPMAN, 1989).

É importante ressaltar que após a exposição aos azo corantes, seja por via oral ou dérmica, os humanos podem se expor aos produtos de biotransformação dos corantes gerados tanto por ação de microorganismo na flora intestinal e da pele, como após reações hepáticas (CHADWICK, GEORGE, CLAXTON, 1992; STAHLMANN et al., 2006). Tal biotransformação pode ocorrer em uma ampla variedade de mamíferos, incluindo tanto o macaco *Rhesus* (PRIVAL; MITCHEL, 1982) como os humanos (WATABE et al., 1980).

1.2.1 Rotas Metabólicas envolvidas na Redução e Oxidação dos Azo Corantes

Os corantes comportam-se como xenobióticos em geral. Após serem absorvidos, eles se distribuem através do organismo, onde exercem algum tipo de ação ou se tornam alvo de mecanismos metabólitos secundários. Esses mecanismos podem produzir compostos menos nocivos, entretanto, podem formar xenobióticos bioativos, ou seja, com maior toxicidade (KLEINOW; MELANCON; LECH, 1987; LIVINGSTONE, 1998). As principais rotas de biotransformação de

corantes são processos envolvendo oxidação, redução, hidrólise e conjugação, os quais são catalisados enzimaticamente (ZOLLINGER, 1991; HUNGER, 1994; ZBAIDA, 1995). No entanto, em humanos a redução e a oxidação biológica de um azo corante são responsáveis pela possível presença de aminas tóxicas no organismo (PIELESZ et al., 2002).

As vias metabólicas seguidas por um azo corante dependerá de vários fatores, tais como: (a) o modo de administração; (b) o grau de absorção do trato gastrointestinal após a administração oral; (c) a extensão da excreção biliar, especialmente após a exposição por outras vias, diferentes da oral; (d) as diferenças genéticas na ocorrência e na atividade do sistema de redução enzimática no fígado; (e) diferenças de espécies na flora intestinal; (f) a atividade e a especificidade relativas dos sistemas hepático e intestinal, particularmente aquelas responsáveis pela redução da ligação azo. Importante lembrar que todos esses fatores estão inter-relacionados (WALKER, 1970).

1.2.1.1 Metabolismo Oxidativo

Compostos com grande solubilidade lipídica são preferencialmente biotransformados por reações oxidativas. Por exemplo, azo corantes com estruturas químicas contendo grupos amino, alquilamino ou acetilamino, sem nenhum grupo sulfonado, são mais propensos à intensa ação do metabolismo oxidativo (HUNGER, 1994).

Processos oxidativos são catalisados principalmente pelo sistema monooxigenase microssomal, representado pelo citocromo P450 (HUNGER, 1994). As isoenzimas do citocromo P450 pertencem a uma superfamília de heme proteínas que estão presentes em todos os organismos vivos. Ademais, estão envolvidas no metabolismo de uma ampla variedade de compostos químicos (DENISOV et al., 2005; MANSUY, 2007).

O mecanismo geral da oxidação metabólica ocorre por meio de uma cadeia transportadora de elétrons que, primeiramente, transfere um elétron para o complexo P-450-Fe³⁺, o qual sofre redução e promove a entrada de oxigênio no substrato, liberando o produto oxidado no organismo. Existem três diferentes processos oxidativos importantes para os azo corantes: C-hidroxilação; N-hidroxilação e Desmetilação (HUNGER, 1994).

A Figura 1 ilustra o processo de **C-hidroxição**, que é caracterizado pela hidroxilação do anel nos azo corantes, provavelmente gerando um epóxido como intermediário da reação de rearranjo ao fenol (HUNGER, 1994).

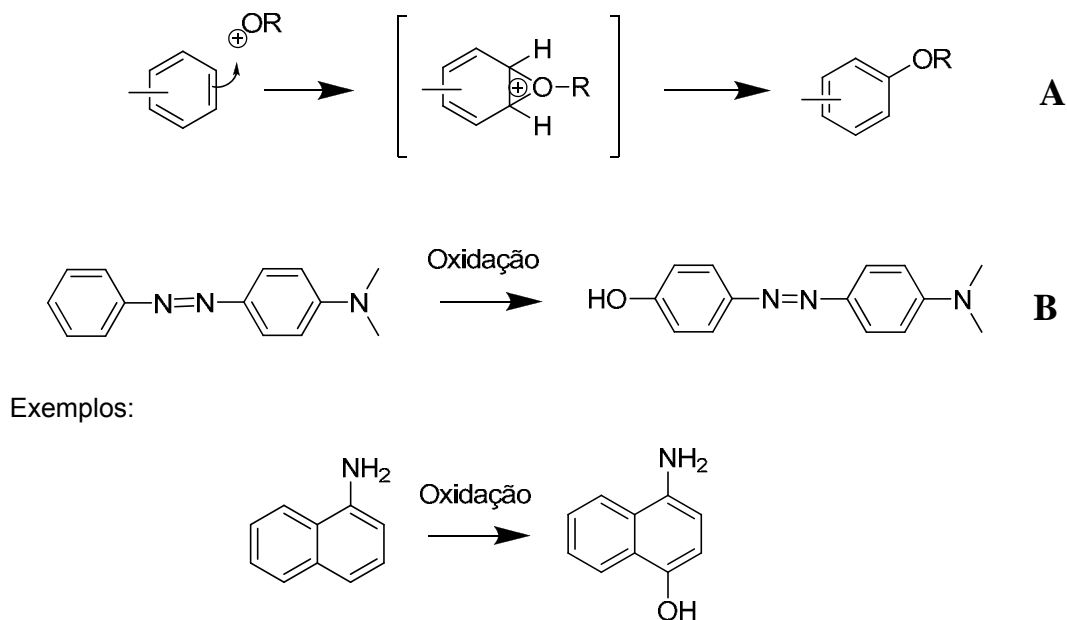


Figura 1 - Processo de C-Hidroxição (Hidroxição do anel) de azo corantes. Sendo (A) a reação genérica e (B) exemplos de corantes oxidados via citocromo P450. Fonte: Hunger, 1994 (modificado).

A **N-hidroxição** é reconhecida como o primeiro passo na ativação de aminas aromáticas aos seus intermediários reativos (PHILLIPSON; IOANNIDES, 1983). O processo de N-hidroxição ocorre em grupos amino primário ou secundário ou em grupos acetilaminos no fígado. Esta reação é seguida por uma esterificação com gluconato ou sulfato. Estes ésteres ativados podem conduzir à excreção de substâncias agora hidrossolúveis ou separar o grupo éster, resultando na formação de um composto nitrênio, conforme mostra Figura 2, sendo que este composto pode ligar covalentemente a um grupo nucleofílico do DNA, como ilustrado com a guanossina na Figura 3 (HUNGER, 1994).

Além disso, a hidroxilação do anel aromático pode ocorrer não somente antes da quebra redutiva do grupo azo, mas também sobre as aminas produzidas por essa redução. Essa via parece ser muito importante em compostos que contêm um radical fenila não-sulfonado (WALKER, 1970).

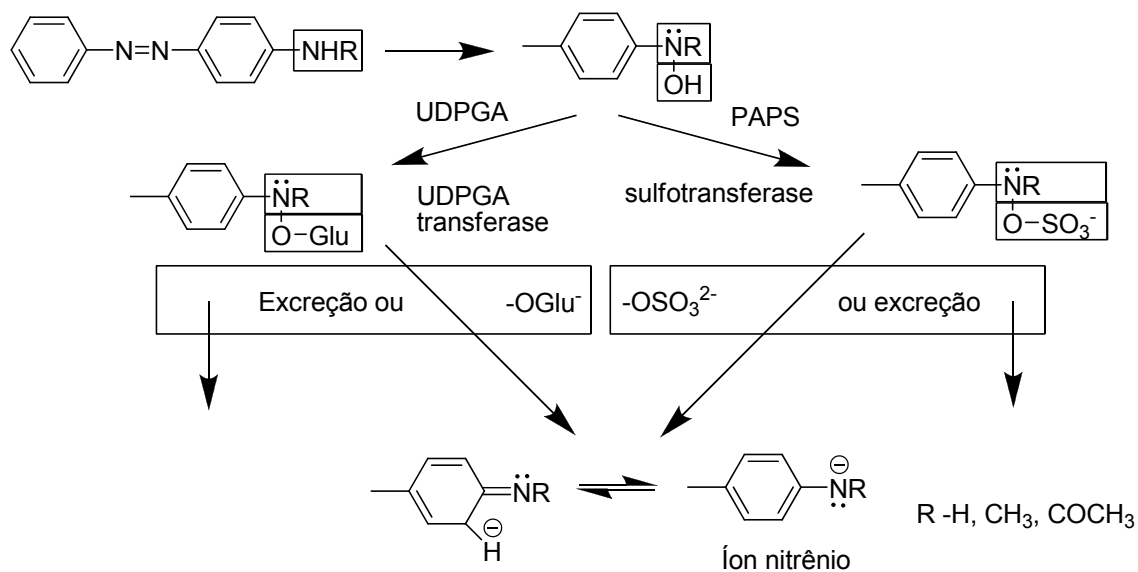


Figura 2 - N-hidroxiilação de um corante do tipo azo, seguida da conjugação e posterior formação de um composto nitrênio. Fonte: Hunger, 2004 (modificado).

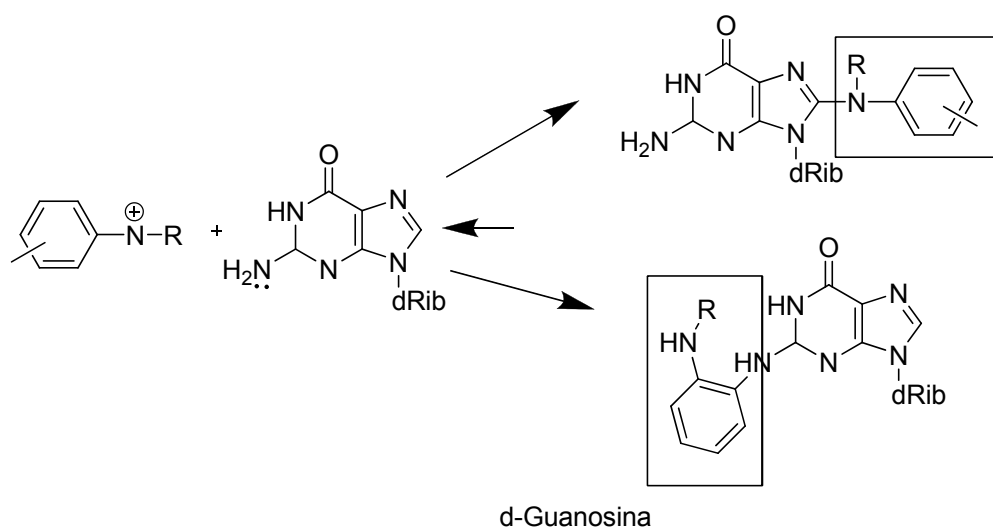


Figura 3 - Reação de um composto nitrênio com o DNA (Guanosina). Fonte: Hunger, 2004 (modificado).

Por fim, tem-se um último processo oxidativo, a Desmetilação. Nesta etapa ocorre a oxidação do grupo metil de compostos dialquilamino. O N-hidroxi derivado pode ser novamente desmetilado (desmetilação secundária) ou reagir com um composto nitrênio, como ilustra a Figura 4 (HUNGER, 1994).

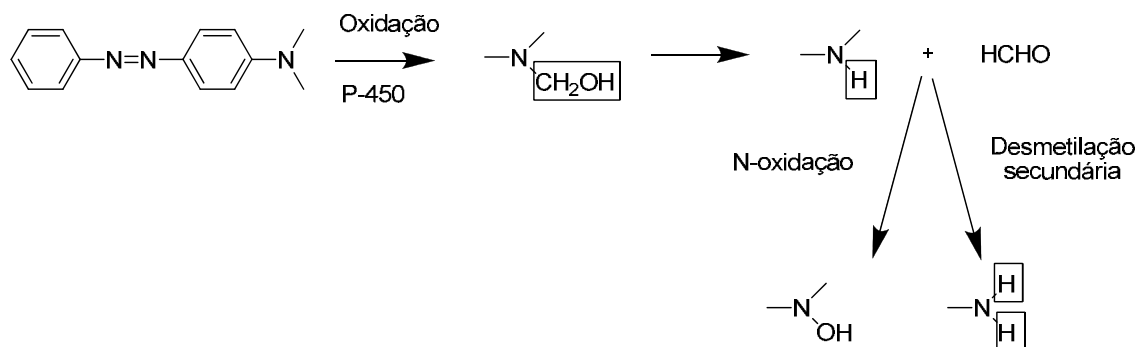


Figura 4 - Processo de Desmetilação (metabolismo oxidativo) de um corante do tipo azo. Fonte: Hunger, 1994 (modificado).

Por exemplo, foi demonstrado que as reações de N-desmetilação, N-oxidação e esterificação estão envolvidas na ativação de p-dimetilaminoazobenzeno a um agente carcinogênico primário enquanto que a detoxificação está associada com a C-oxidação e a clivagem redutiva da ligação azo (ZBAIDA, 1989).

1.2.1.2 Metabolismo Redutivo

Outra via importante de biotransformação de corantes é a redução, formando, principalmente, aminas aromáticas. Essa reação pode ser catalisada pelas enzimas hepáticas de mamíferos ou pelas bactérias intestinais (FRANCE; CARTER; JOSEPHY, 1986; GOLKA; KOPPS; MYSLAK, 2004). Portanto, essa redução pode produzir compostos que são mais ou menos tóxicos em comparação com a molécula original (RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997), dependendo da estrutura química do metabólito gerado.

Os azo corantes que entram no corpo humano pela ingestão podem ser metabolizados em aminas aromáticas pelas azorredutases dos microorganismos intestinais. Se os azo corantes forem nitro, podem ser metabolizados pelas nitrorredutases produzidas pelos mesmos microorganismos (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992; UMBUZEIRO et al., 2005b). Enzimas hepáticas de mamíferos e outros organismos podem também catalisar a clivagem redutiva da ligação azo e a nitrorredução do grupo nitro, entretanto, tem sido mostrado que as enzimas da microflora intestinal apresentam o mais importante papel neste tipo de metabolismo. Em ambos os casos, se N-hidroxilaminas são formadas, tais compostos são capazes de causar danos ao DNA. Se os corantes são completamente reduzidos a aminas aromáticas, podem ser oxidados também a N-hidroxiderivados pelas enzimas do citocromo P450. Além disso, os radicais N-hidróxi podem ser acetilados pelas enzimas, tais como O-acetiltransferase, gerando

íons eletrofílicos de nitrênio capazes de reagir com o DNA para formar adutos (BARTSCH, 1981; CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992; ARLT et al., 2002; UMBUZEIRO et al., 2005b), como mostrado na Figura 5. A geração de espécies reativas de oxigênio também parece estar envolvida na genotoxicidade de amins *O*-hidróxi-aromáticas (SWEENEY; CHIPMAN; FORSYTHE, 1994).

É provável que os efeitos tóxicos e/ou carcinogênicos dos azo corantes sejam devido à clivagem redutiva dos produtos, por exemplo: a formação de 1-amino-2-naftol, produzido pela redução do grupo azo do corante Orange II, induziu tumores na bexiga de ratos (BONSER; CLAYSON; JULL, 1963; CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992). Isto sugere que a toxicidade induzida pelas moléculas inalteradas de azo corantes não deveria ser interpretada como único efeito destes compostos, visto que os produtos resultantes da clivagem redutiva desses corantes podem ser mutagênicos/carcinogênicos (FIELD et al., 1977; CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992). Tal fato foi demonstrado em estudos com *Trypan Blue*, o qual é teratogênico e carcinogênico (FIELD et al., 1977). Este corante sozinho não é mutagênico, mas após sofrer redução, este composto produziu um produto mutagênico: *O*-toluidina (HARTMAN; FULK; ANDREWS, 1978). Conforme já citado, a benzidina gerada após a redução de alguns corantes induz câncer de bexiga em humanos e tumores em alguns experimentos com animais (COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982; CHUNG, 1983).

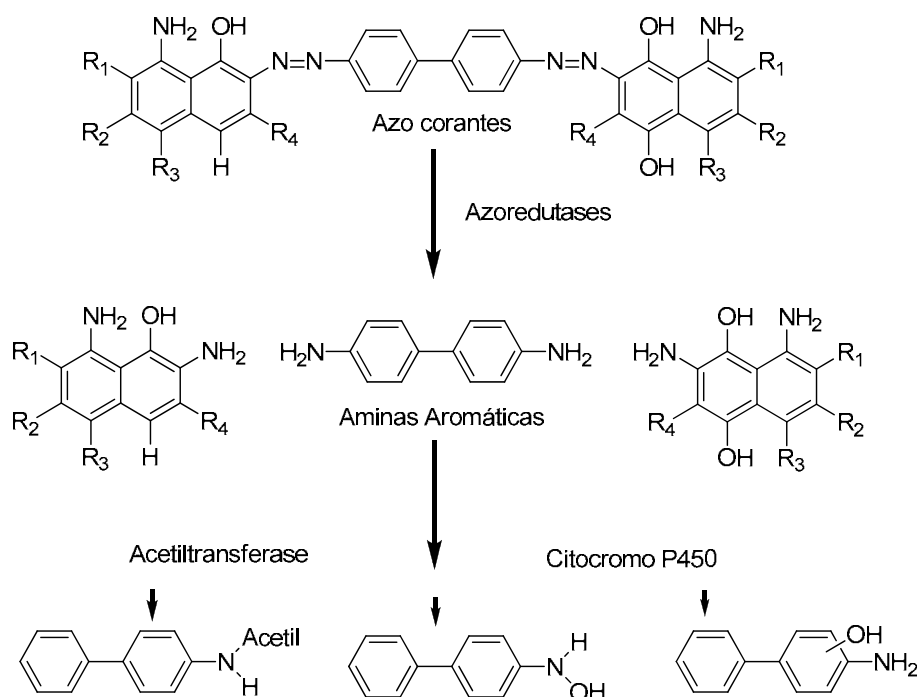


Figura 5 - Redução de azo corantes a partir da ação de azoredutases da microflora intestinal, seguida da ação de acetiltransferases e citocromo P450. Fonte: Chung; Stevens; Cerneglia, 1992 (modificado).

Segundo Zbaida (1989, 2000), um total de quatro elétrons é requerido para a redução de uma ligação azo a aminas primárias, no entanto a redução microsossomal dos azo corantes, provavelmente, envolve um ciclo de redução de dois elétrons conduzindo à formação do composto intermediário: o hidrazo, conforme mostra a Figura 6. A pesquisa de Zbaida (1989) demonstrou que a hidroxilação de azo corante não reativo, como o azobenzeno, aumenta a sua ligação ao citocromo P-450 microsossomal e, conseqüentemente, a sua taxa de redução.

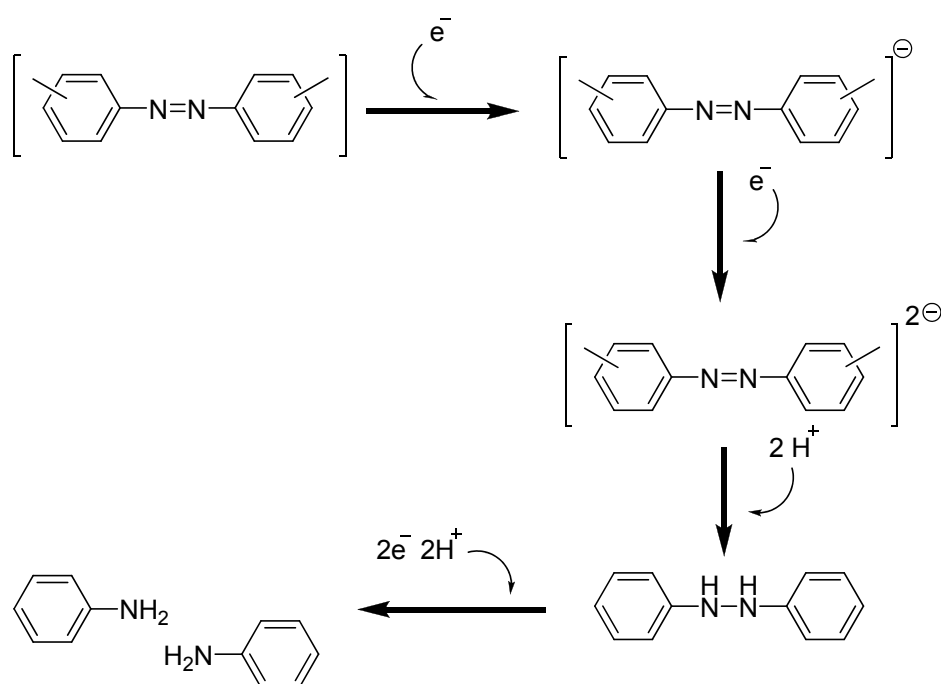


Figura 6 - Processo de redução metabólica de um azo corante aromático. Fonte: Hunger, 1994 (modificado).

Estudos com corantes mono azo indicaram que a baixa densidade eletrônica na região da ligação azo favorece a redução (WALKER; RYAN, 1971; COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982). Isso pode ser causado pela ligação do hidrogênio a um átomo de nitrogênio do grupo azo juntamente com um grupo naftol proximal, produzindo, assim, uma configuração ceto-hidrazona. É possível que uma estrutura deste tipo, a qual é formada por muitos corantes alimentícios, gere corantes mais resistentes à redução hepática e microbiana (COMBES; HAVELAND-SMITH, 1982).

Assim, a clivagem redutiva da ligação azo é provavelmente a reação metabólica de maior importância toxicológica dos compostos azoicos (CHUNG; STEVENS; CERNEGLIA, 1992).

É importante destacar que, devido aos trabalhos publicados com o tema “corantes”, fui convidada para escrever o capítulo intitulado “Azo dyes and their metabolites: Does the discharge of the azo dye into water bodies represent human and ecological risks?” no livro "Textile Dyeing / Book 2", ISBN 979-953-307-032-1, editado pelo Prof. Dr. Peter Hauser, sendo que já obtive a resposta da aceitação do manuscrito para a publicação.

Considerando o exposto, neste trabalho foi avaliada a capacidade de ligação dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 com o DNA e a base nitrogenada guanosina, a fim de elucidar o mecanismo de ação mutagênica. Adicionalmente, foi realizada a análise do potencial mutagênico do corante Disperse Red 1 e de seus metabólitos por meio do teste de mutação gênica em células de linfomas de camundongo (*Mouse Lymphoma Assay*). Também foram avaliados os produtos de oxidação e redução dos azo corantes estudados, por meio do teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*.

1.3 Avaliação dos danos induzidos pelos corantes e por seus produtos de biotransformação ao material genético

Neste trabalho foram utilizadas três técnicas para avaliar a capacidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 e de seus produtos de biotransformação de se ligarem ao DNA: uma espectrofotométrica (que será explicado no item Material e Métodos) e duas biológicas, quais sejam, teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongo e ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, descritos a seguir.

Teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongo

Este ensaio foi realizado na Universitat Autònoma de Barcelona, na Espanha, sob a orientação do Prof. Dr. Ricard Marcos. O ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo ou *Mouse Lymphoma Assay* (MLA) é o mais amplamente utilizado dos vários ensaios *in vitro* de mutação gênica em células de mamíferos existentes (SORIANO; CREUS; MARCOS, 2007). Este ensaio foi originalmente desenvolvido por Clive e colaboradores em 1972, que utilizavam *soft agar* para clonar e contar as colônias mutantes (CLIVE et al., 1972).

O MLA quantifica alterações genéticas que afetam a expressão do gene TK da enzima timidina quinase (*Tk*) em células L5178Y TK^{+/-} de linfoma de camundongo (CLIVE et al., 1979). Essa linhagem celular é heterozigótica para o locus autossômico da timidina kinase, situado na parte distal do cromossomo 11 de camundongo. As células heterozigotas *Tk*^{+/-}, quando crescem em suspensão, mutam espontaneamente a *Tk*^{-/-} com uma frequência de 2×10^{-6} mutações/lócus/geração. Enquanto que a frequência de reversão espontânea de *Tk*^{-/-} a *Tk*^{+/-} é 300 vezes inferior, 6×10^{-9} mutações/lócus/geração, sendo considerada desprezível em um ensaio de genotoxicidade e sem repercussão importante nos resultados (CLIVE et al., 1979; TÁRRAGA, 2009). Ademais, na linhagem L5178Y os cromossomos 11 homólogos são essencialmente iguais, embora diferenciem entre si devido a um heteromorfismo centromérico. O cromossomo homólogo com centrômero mais curto é conhecido como 11a, enquanto que o de maior tamanho é chamado 11b (HOZIER et al., 1982; SAWYER et al., 1985; TÁRRAGA, 2009).

O espectro de detecção do ensaio abrange mutações gênicas (mutações de ponto) e eventos cromossômicos (deleções, translocações, recombinações mitóticas/ conversão gênica e aneuploidia) (LIMA, RIBEIRO, 2003). Tendo em vista a localização autossômica do gene *Tk*, este ensaio detecta não somente eventos intragenéticos, como também os pontos de mutação bem como a perda de heteroziguidade. Este fato pode resultar na perda do gene *Tk* inteiro, o que conduz às deleções cariotipicamente visíveis e rearranjos do transporte do cromossomo *Tk*⁺ (SORIANO; CREUS; MARCOS, 2007). Dessa maneira, essas características fazem com que esse ensaio com células de linfomas de camundongo seja particularmente útil para a avaliação da capacidade de substâncias químicas de induzir uma extensa variedade de eventos mutacionais (HARRINGTON-BROCK; COLLARD; CHEN, 2003).

O MLA, além de quantificar mutações gênicas no locus timidina quinase (*tk*), também tem sido amplamente usado, por muitos anos, para determinar o potencial genotóxico de substâncias químicas (CLEMENTS, 2000) e ainda em testes de mutagenicidade de curta duração (DOERR; HARRINGTON-BROCK; MOORE, 1989). Ademais, esse ensaio é útil para prever a clastogenicidade de um composto químico (HOZIER et al., 1985; DOERR; HARRINGTON-BROCK; MOORE, 1989). Por meio desse ensaio, também é possível determinar a proporção relativa de dois tipos de mutantes (colônias pequenas e largas): a indução de pequenas colônias

mutantes é associada a alterações cromossômicas no cromossomo 11, o qual contém o locus *tk*, enquanto que largas colônias de mutantes podem ser associadas a eventos de menor escala, talvez mutações em um único gene (HOZIER et al., 1985). O Instituto Nacional de Câncer utiliza dados desse teste para auxiliar na seleção de substâncias químicas para bioensaios crônicos e para apoiar atividades de pesquisa intramural (CAMERON et al., 1985, 1987).

Princípio do teste:

Como mencionado, o MLA utiliza células de linfoma de camundongos L5178Y ($Tk^{+/-}$ linhagem clonal 3.7.2c.). Essas células contêm a enzima timidina quinase (*tk*) e são sensíveis aos efeitos citostáticos e citotóxicos de concentrações apropriadas de trifluorotimidina (TFT) (MOORE-BROWN et al., 1981). Assim, a metodologia fundamenta-se na perda de heterozigotidade do *locus* da enzima timidina quinase ($tk^{+/-} \rightarrow tk^{-/-}$) quando o gene é afetado por um agente mutagênico, ocasionando resistência das células mutadas ($TK^{-/-}$) à suplementação do meio com TFT (CLEMENTS, 2000). A TFT, análogo à timidina, causa inibição do metabolismo impedindo a divisão celular e levando à morte as células que possuem íntegra a via de recuperação de nucleosídeos (pelo menos um alelo TK^{+}) (LIMA, RIBEIRO, 2003). Portanto, mutações a um único gene TK funcional pode resultar na perda da atividade TK e, conseqüentemente, na aquisição de resistência à TFT. Estas células mutantes podem ser quantificadas após um período de expressão adequado pelo clone em meio agar suplementado com agente seletivo, a TFT (MOORE-BROWN et al., 1981).

Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O ensaio *Salmonella typhimurium*/microsoma, também conhecido como Teste *Salmonella* ou Teste de Ames, é um ensaio bacteriano de curta duração, amplamente aceito para identificação de substâncias que podem produzir dano genético, o qual conduz a mutações nos genes (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). É usado mundialmente como um ensaio inicial para determinar o potencial mutagênico de novas drogas e substâncias químicas porque há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (McCANN et al., 1975; ZEIGER et al., 1990; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Este ensaio está em uso há mais de 20 anos tendo em vista a sua alta sensibilidade e reconhecida validação (ASHBY; TENNANT, 1991; JARVIS et al., 1996; KAPLAN et al., 2004). Além disso, é recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) para proteção da saúde humana e do meio ambiente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004) e por comunidades científicas, agências e corporações governamentais (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Este teste utiliza um número de linhagens de *Salmonella* com mutações preexistentes que deixam a bactéria incapaz de sintetizar o aminoácido requerido, a histidina, e, portanto, incapaz de crescer e formar colônias na ausência do mesmo. Novas mutações no lugar destas mutações pré-existentes, ou próximas aos genes, podem restaurar a função dos genes e permitir que as células sintetizem histidina. Essas células novamente mutadas podem crescer na ausência de histina e formarem colônias. Por esta razão, o teste é freqüentemente referido como um “ensaio de reversão” (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Bactérias não têm o sistema de oxidação citocromo P450 usado pelos vertebrados em detoxificação metabólica de compostos exógenos. Como alguns dos metabólitos produzidos pelo citocromo P450 são mutagênicos, é importante mimetizar esse sistema nos ensaios com bactérias através da adição de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com Aroclor-1254 (mistura S9). Desse modo, os pró-mutágenos, ou seja, substâncias que exercem sua atividade mutagênica após metabolização, serão detectados pela adição de S9 e os mutágenos de ação direta, isto é, aqueles que não precisam ser metabolizados via citocromo P450 para exercerem seu efeito mutagênico serão identificados sem S9 (AMES; McCANN; YAMASAKI, 1975; MARON; AMES, 1983; JARVIS et al., 1996).

Este teste emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parenteral LT2, auxotróficas para histidina (*his⁻*), apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a sua capacidade de síntese. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada

(UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). As linhagens de *Salmonella* utilizadas neste teste são pertencentes ao grupo de Enterobactérias, que são capazes de produzir nitrorredutase e azorredutase (UMBUZEIRO et al., 2005b).

Além da mutação no *operon* da histidina, as linhagens apresentam características genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos tipos de agentes mutagênicos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

As enzimas acetiltransferase e nitrorredutase estão envolvidas na ativação metabólica intracelular de nitroarenos e amins aromáticas em *Salmonella typhimurium*. O plasmídeo contendo ambos os genes da acetiltransferase e nitrorredutase foi introduzido nas *S. typhimurium* TA98 e TA100. As linhagens resultantes, YG1041 e YG1042, respectivamente, mostraram altos níveis de ambas atividades enzimáticas e são mais sensíveis à ação mutagênica de alguns compostos nitro-aromáticos (HAGIWARA et al., 1993).

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 a ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria com características metabólicas similares à flora intestinal de mamíferos (UMBUZEIRO et al., 2005b). Assim, neste trabalho foram escolhidas as linhagens TA98 e YG1041, baseado no trabalho de Ferraz (2008), para avaliação da mutagenicidade dos produtos.

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

Linhagem	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; Ames, 1983; Umbuzeiro et al., 2005b
YG1041	<i>hisD3052</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , Δ <i>bio</i> ³ , Δ <i>uvrB</i> ⁴ , pKM101 (Apr) ⁵ , com alta produção de nitrorredutase e O-acetiltransferase (pYG233) (Cn ^r) ⁶	Deslocamento do quadro de leitura	Hagiwara et al., 1993; Umbuzeiro et al., 2005b

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 Apr ampicilina resistent

⁶ Cnr canamicina resistente

Tendo em vista o que foi mostrado anteriormente, este trabalho teve como objetivo investigar e analisar os produtos obtidos após a biotransformação dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1, cujas estruturas químicas estão mostradas na Figura 7.

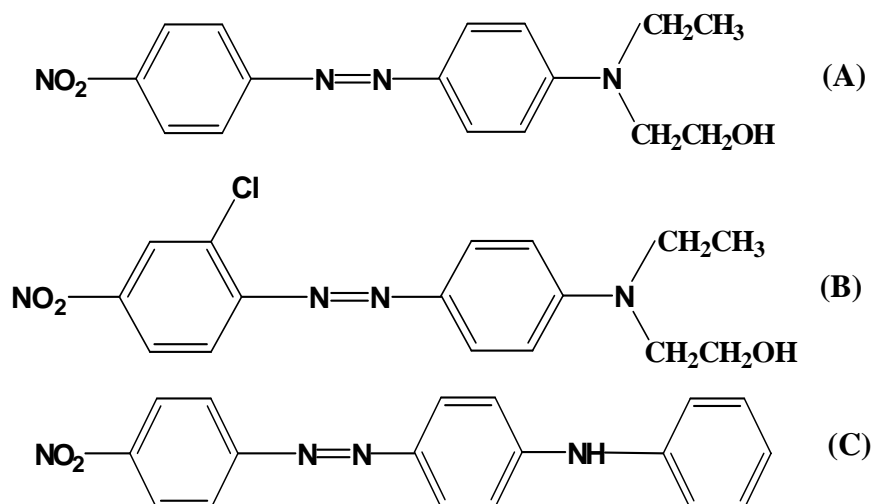


Figura 7 - Estrutura química dos azo corantes selecionados como modelo: (A) Disperse Red 1, (B) Disperse Red 13, (C) Disperse Orange 1.

Os potenciais mutagênicos desses azo corantes foram estudados em diferentes parâmetros (CHEQUER, 2008, 2009; FERRAZ, 2008, 2010). Os estudos mostraram que os três compostos aumentaram a frequência de MNs tanto em linfócitos humanos como em células HepG2, em relação aos controles negativos. Para o teste de MNs em linfócitos humanos, a média do número de MNs induzidos em 1000 células binucleadas analisadas pelo corante Disperse Red 13 é maior em relação ao apresentado pelos corantes Disperse Red 1 e Disperse Orange 1, o que indica ser este o corante com maior potencial mutagênico nas condições do ensaio. Já em células HepG2, os três corantes apresentaram potenciais mutagênicos semelhantes, visto que a média do número de MNs apresentada pelos corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 foi semelhante (CHEQUER, 2008, 2009).

Adicionalmente, os potenciais mutagênicos destes mesmos corantes foram confirmados por meio do ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, utilizando as linhagens TA98, YG1041, TA100 e YG1042, na presença e ausência de ativação metabólica (mistura S9). Tal mutagenicidade foi significativamente mais

intensa 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 com as linhagens superprodutoras de nitrorredutase 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 nitrorredução e acetilação na ativação destes compostos. Porém, foi observada uma redução da mutagenicidade dos três corantes após a adição do sistema de metabolização exógena (S9) (FERRAZ, 2008, 2010). Embora esses dados tenham mostrado que as reações de biotransformação são capazes de alterar a mutagenicidade dos corantes, há pouco conhecimento sobre a biotransformação dos azo corantes pelas bactérias intestinais humanas e de enzimas animais, as quais são capazes de degradar compostos (SEESURIYACHAN et al., 2007).

Dessa forma, neste trabalho foi realizada a investigação dos produtos oriundos dos processos de oxidação e redução dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1. Para tanto, inicialmente foram realizados ensaios eletroquímicos, simulando as condições endógenas de oxidação e redução dos corantes, e acompanhamento da modificação do grupo cromóforo (perda de cor) por meio de análises espectrofotométricas e por CLAE/DAD. Paralelamente, foram realizados ensaios semelhantes utilizando o sistema de oxidação microsossomal S9 nas condições do ensaio *Salmonella*/microsossoma, acompanhando os produtos da mesma forma citada acima. Propomos também a identificação das aminas aromáticas e de outros compostos gerados após a biotransformação desses corantes estudados empregando CLAE/DAD e CG/EM. E, conforme mencionado anteriormente, o potencial mutagênico desses produtos formados foi analisado por meio do ensaio de mutação gênica em células de linfoma de camundongo e do teste de Ames. Ainda, foi investigada a capacidade de ligação dos corantes originais com o DNA e a guanosina, a fim de elucidar o mecanismo de ação mutagênica desses compostos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A formação de adutos com o DNA, especificamente com a base guanosina, não é o mecanismo de ação tóxica preferencial para os azo corantes Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1;
- O corante Disperse Red 1 e seus produtos de biotransformação apresentaram resultados negativos no teste de mutação gênica em células de linfoma de camundongos;
- Tanto os produtos de oxidação como os de redução dos três corantes estudados apresentaram potencial mutagênico ao serem testados no Ensaio *Salmonella*/microsoma;
- Espectrofotometria na região UV-visível e Eletrólise a Potencial Controlado são duas técnicas capazes de promover a oxidação e a redução dos azo corantes em estudo;
- Após a oxidação química do corante Disperse Red 1 foram formados os seguintes produtos: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, nitrobenzeno e 4-nitro-benzamina; já a oxidação química do corante Disperse Red 13 gerou: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada e 2-cloro-4-nitro-benzamina; e, por fim, benzamina, nitrobenzeno, N-fenil-benzamina e N-fenil-1,4 benzenodiamina são compostos provenientes da oxidação química do corante Disperse Orange 1;
- Após a redução química do corante Disperse Red 1 formou-se os seguintes produtos: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, 4-nitro-benzamina e 2-(etilfenilamino)-etanol; da redução química do corante Disperse Red 13 formaram-se: sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada, 4-nitro-benzamina, 2-(etilfenilamino)-etanol e 2-cloro-4-nitro-benzamina; enquanto que benzamina, nitrobenzeno, N-fenil-benzamina e N-fenil-1,4-benzenodiamina foram os compostos oriundos da redução química do corante Disperse Orange 1;

- Esses azo corantes originais em contato com S9 sofrem oxidação e formam novos produtos, sendo que sulfato 2-[(4-aminofenil)etilamino]- etanol monohidratada é produto oriundo do corante Disperse Red 1; 2-cloro-4-nitro-benzamina, do corante Disperse Red 13 e benzamina proveniente do corante Disperse Orange 1;
- Alguns dos produtos de oxidação e redução desses azo corantes são conhecidos por apresentarem potencial mutagênico e, portanto, esses azo corantes representam uma grande ameaça tanto ao ser humano como ao meio ambiente, não somente na forma original, como já demonstrado por nosso grupo, mas também após os processos de biotransformação.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AL-SABTI, K. Chlorotriazine Reactive Azo Red 120 Textile Dye Induces Micronuclei in Fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 47, n. 2, p.149-155, 2000.

AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 6, p. 347-364, 1975.

ANLIKER, R. Ecotoxicology of dyestuffs - a joint effort by industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 3, n. 1, p. 59-74, 1979.

ARLT, V.M.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PABEL, U.; SORG, B.L.; SCHMEISER, H.H.; PHILLIPS, D.H. Metabolic activation of the environmental contaminant 3 nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1937-1945, 2002.

ASHBY, J.; TENNANT, R. W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 257, n. 3, p. 229-306, 1991.

ASHBY, J.; VLACHOS, D.A.; TINWELL, H. Activity of aniline in the mouse bone marrow micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 263, n. 2, p. 115-117, 1991.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). **Definição**. Brasília. Disponível em: < <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>>. Acesso em: 16 Ago. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). **História**. Brasília. Disponível em: < http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp>. Acesso em: 16 Ago. 2006.

BAE, J.S.; FREEMAN, H.S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 73, n. 1, p. 81-85, 2007.

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

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

BENOIT, F.; HOLMES, J.L. The mechanism of NO loss from the molecular ion of nitrobenzene and the fragmentation behaviour of the phenoxy and *p*-aminophenoxy cations. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, London, n. 16, p. 1031-1032, 1970

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., MCCANN, J., PIKE, M.C.. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.97, n. 4, p.267-281, 1982.

BHATKHANDI, D.S.; PANGARKAR, V.G.; BEENACKERS, A.A.C.M. Photocatalytic degradation of nitrobenzene using titanium dioxide and concentrated solar radiation: chemical effects and scaleup. **Water Research**, Oxford, v. 37, n. 6, p.1223-1230, 2003.

BONSER, G.M.; CLAYSON, D.B.; JULL, J.W. The potency of 20-methylcholanthrene relative to other carcinogens on bladder implantation. **British Journal of Cancer**, London, v.17, n. 2, p.235-241, 1963.

BOMHARD, E.M. High-dose clastogenic activity of aniline in the rat bone marrow and its relationship to the carcinogenicity in the spleen of rats. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 77, n. 5, p. 291-297, 2003.

BOMHARD, E.M.; HERBOLD, B.A. Review: Genotoxic activities of aniline and its metabolites and their relationship to the carcinogenicity of aniline in the spleen of rats. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 35, n. 10, p. 783-835, 2005.

BROWN, J.P.; ROEHM, G.W.; BROWN, R.J. Mutagenicity testing of certified food colours and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the Salmonella/microsome system. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 249-271, 1978 (Abstract).

CAMERON, T.P.; HUGHES, T.J.; KIRBY, P.E.; PALMER, K.A.; FUNG, V.A.; DUNKEL, V.C. Mutagenic activity of 5 thiazole compounds in the Salmonella/microsome and mouse lymphoma TK ^{+/-} assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 155, n. 1-2, p. 17-25, 1985.

CAMERON, T.P.; HUGHES, T.J.; KIRBY, P.E.; FUNG, V.A.; DUNKEL, V.C. Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella/microsome and mouse lymphoma TK ^{+/-} assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 189, n. 5, p. 223-261, 1987.

CARLIELL, C.M.; BARCLAY S.J.; NAIDOO N.; BUCKLEY C.A.; MULHOLLAND, D.A.; SENIOR, E. (1995). Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water SA**, Gezina, v. 21, n. 1, p. 61-69, 1995.

CERNIGLIA, C.E.; FREEMAN, J.P.; FRANKLIN, W.; PACK, L.D. Metabolism of benzidine and benzidinecongener based dyes by human, monkey and rat intestinal bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 107, n. 4, p. 1224-1229, 1982.

CERNIGLIA, C.E.; ZHUO, Z.; MANNING, B.W.; FEDERLE, T.W.; HEFLICH, R.H. Mutagenic activation of the benzidine-based dye Direct Black 38 by human intestinal microflora. **Mutation Research**, Amsterdam, v.175, n. 1, p. 11-16, 1986.

CHADWICK, R.W.; GEORGE, S.E.; CLAXTON, L.D. Role of the gastrointestinal mucosa and microflora in the bioactivation of dietary and environmental mutagens or carcinogens. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 24, n. 4, p. 425-492, 1992.

CHANG, J.S.; CHIEN CHOU, C.; YU-CHIH LIN, Y.C.; PING-JEI LIN, P.J.; JIN-YEN HO, J.Y.; HU, T.L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Research**, New York, v. 35, n. 12, p. 2841-2850, 2001.

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 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**, Amsterdam, v. 676, n. 1-2, p. 83-86, 2009. Errata em: **Mutation Research**, Amsterdam, v. 702, n. 1, p. 129, 2010.

CHOUDHARY, G. Human health perspectives on environmental exposure to benzidine: a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 267-291, 1996.

CHUNG, K.T.; FULK, G.E.; ANDREWS, A.W. The mutagenicity of methyl orange and metabolites produced by intestinal anaerobes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 58, n. 2-3, p. 375-379, 1978.

CHUNG, K.T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.114, n. 3, p.269-281, 1983.

CHUNG, K.T.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. **Mutation Research**, Amsterdam, v.277, n. 3, p.201-220, 1992.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E.; CERNIGLIA, C.E. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 18, n. 3, p. 175-190, 1992.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Houston, v. 12, n. 11, p. 2121-2132, 1993.

CHUNG, K.T.; CHEN, S.C.; ZHU, Y.Y.; WONG, T.Y.; STEVENS, S.E. Toxic effects of some benzamines on the growth of *Azotobacter vinelandii* and other bacteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Houston, v. 16, n. 7, p. 1366-1369, 1997.

CHUNG, K.T.; HUGHES, T.J.; CLAXTON, L.D. Comparison of the mutagenic specificity induced by four nitro-group-containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium* his genes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 465, n. 1-2, p. 165-171, 2000.

CLEMENTS, J. The Mouse Lymphoma Assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 97-110, 2000.

CLIVE, D.; FLAMM, W.G.; MACHESKO, M.R.; BERNHEIM, N.J. A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 77-87, 1972.

CLIVE, D.; SPECTOR, J.F.S. Laboratory procedure for assessing specific locus mutation at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 17-29, 1975.

CLIVE, D.; JOHNSON, K.O.; SPECTOR, J.F.S.; BATSON, A.G.; BROWN, M.M.M. Validation and characterization of the L5178Y/TK^{+/-} mouse lymphoma mutagen assay system. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 61-108, 1979.

COLLIER, S.W.; STORM, J.E.; BRONAUGH, R.L. Reduction of azo dyes during *in vitro* percutaneous absorption. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 118, n. 1, p. 73-79, 1993.

COMBES, R.D.; HAVELAND-SMITH, R.B. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 101-248, 1982.

COTTALASSO, D.; PRONZATO, M.A.; DOMENICOTTI, C.; BARISIONE, G., FONTANA, L., NANNI, G. Toxicity of 4-chloro-2-nitroaniline and 2-chloro-4-nitroaniline to isolated rat hepatocytes. **La Medicina del lavoro**, Fidenza, v. 82, n. 3, p. 253-260, 1991.

CREBELLI, R.; CONTI, L.; CARERE, A.; ZITO, R. Mutagenicity of commercial *p*-phenylenediamine and of an oxidation mixture of *p*-phenylenediamine and resorcinol in *Salmonella typhimurium* TA98. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 79-84, 1981.

DENISOV, I.G.; MAKRIS, T.M.; SLIGAR, S.G.; SCHLICHTING, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. **Chemical Reviews**, Washington, v. 105, n. 6, p. 2253-2277, 2005.

DIPPLE, A.; MICHEJDA, C.J.; WEISBURGER, E.K. Metabolism of chemical carcinogens. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 265-296, 1985.

DOERR, C.L.; HARRINGTON-BROCK, K.; MOORE, M.M. Micronucleus, chromosome aberration, and small-colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 222, n. 3, p. 191-203, 1989.

ESANCY, J.F.; FREEMAN, H.S.; CLAXTON, L.D. The effect of alkoxy substituents on the mutagenicity of some aminoazobenzene dyes and their reductive-cleavage products. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 1-22, 1990.

ESPINOSA-AGUIRRE, J.J.; REYES, R.E.; CORTINAS de NAVA, C. C. Mutagenic activity of 2-chloro-4-nitroaniline and 5-chlorosalicylic acid in *Salmonella typhimurium*: two possible metabolites of niclosamide. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 264, p. 139-145, 1991.

FERRAZ, E.A. **Comparação da mutagenicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade com *Salmonella***: USP, 2008. 102 páginas. Dissertação (mestrado). Programa de Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 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**, New York, p. 1-9, 2010. In press.

FIELD, F.E.; ROBERTS, G.; HALLOWES, R.C.; PALMER, A.K.; KENNETH E. WILLIAMS, K.E.; LLOYD, J.B. Trypan blue: identification and teratogenic and oncogenic activities of its coloured constituents. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 69-88, 1977.

FOLK, T.L.; WIDEMAN, L.G. Competing Fragmentations in the Mass Spectra of Halogenated Phenols. **Chemical Communications**, Cambridge, n. 9, p. 491-492, 1969.

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

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**, Oxford, v. 24, n. 2, p.165-169, 1986.

FREEMAN, H.S.; ESANCY, J.F.; CLAXTON, L.D. An approach to the design of non mutagenic azo dyes: analogs of the mutagen CI Direct Black 17. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 13, n. 1, p. 5-77, 1990.

FUJITA, S.; PEISACH, J. Liver microsomal cytochromes *P*-450 and azoreductase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 253, n. 13, p. 4512-4513, 1978.

GARG, A.; BHAT, K.L.; BOCK, C.W. Mutagenicity of aminoazobenzene dyes and related structures: a QSAR/QPAR investigation. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 55, n. 1, p. 35-52, 2002.

GARNER, R.C.; NUTMAN, C.A. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. **Mutation Research**, v. 44, n. 1, p. 9-19, 1977.

GARRIGÓS, M.C.; RECHE, F.; MARÍN, M.L.; JIMÉNEZ, A. Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 976, n. 1-2, p. 309-317, 2002.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z.W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 203-210, 2004.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Textile dyes. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

HAGIWARA, Y.; WATANABE, M.; ODA, Y.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 291, n. 3, p. 171-180, 1993.

HARRINGTON-BROCK, K.; COLLARD, D.D.; CHEN, T. Bromate induces loss of heterozygosity in the *Thymidine kinase* gene of L5178Y/Tk^{+/-}-3.7.2C mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 21-28, 2003.

HARTMAN, C.P.; FULK, G.E.; ANDREWS, A.W. Azo reduction of trypan blue to a known carcinogen by a cell-free extract of a human intestinal anaerobe. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 58, n. 2-3, p. 125-132, 1978.

HASHIMOTO, Y.; WATANABE, H.; DEGAWA, M. Mutagenicity of methoxyl derivatives of N-hydroxy-4-amino-azobenzenes and 4-nitroazobenzene. **Gann**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 373-374, 1977.

HAVELAND-SMITH, R.B.; COMBES, R. D. Screening of food dyes for genotoxic activity. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 215-221, 1980a.

HAVELAND-SMITH, R.B.; COMBES, R.D. Genotoxicity of the food colours Red 2G and Brown FK in bacterial systems: use of structurally-related dyes and azo-reduction. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 223-228, 1980b.

HONMA, M.; HAYASHI, M. ; SHIMADA, H.; TANAKA, N.; WAKURI, S.; AWOGI, T.; YAMAMOTO, K.I.; KODANI, N.; NISHI, Y. ; NAKADATE, M. ; SOFUNI, T. Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test. **Mutagenesis**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 5-22, 1999.

HOZIER, J.; SAWYER, J.; A, CLIVE, D.; MOORE, M. Cytogenetic distinction between the TK⁺ and TK⁻ chromosomes in the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C mouse-lymphoma cell line. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 105, n. 6, p. 451-456, 1982.

HOZIER, J.; SAWYER, J.; CLIVE, D.; MOORE, M.M. Chromosome 11 aberrations in small colony L5178Y TK^{-/-} mutants early in their clonal history. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 5, p. 237-242, 1985.

HUNGER, K. On the toxicology and metabolism of azo dyes. **Chimia**, Bern, v. 48, p. 520-522, 1994.

JÄGER, I.; HAFNER, C.; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 561, n. 1-2, 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**, New York, v. 33, n. 2, p. 193-200, 1996.

JIN, X.C.; LIU, G.Q.; XU, Z.H.; TAO, W.Y. Decolourisation of a Dye Industry Effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 239-243, 2007.

JONES, E.; FOX, V. Lack of clastogenic activity of aniline hydrochloride in the mouse bone marrow. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 283-286, 2003.

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, n. 18, p. 4019-4027, 2004.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; CROWLEY, D.E. Biodegradation potential of pure and mixed bacterial cultures for removal of 4-nitroaniline from textile dye wastewater. **Water Research**, New York, v. 43, n. 4, p. 1110-1116, 2009.

KHAN, M.F.; KANNAN, S.; WANG, J. Activation of transcription factor AP-1 and mitogen-activated protein kinases in aniline-induced splenic toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 210, n. 1-2, p. 86-93, 2006.

KLEINOW, K.M.; MELANCON, M.J.; LECH, J.J. Biotransformation and Induction: Implications for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 71, p. 105-119, 1987.

KRIŽANEC, B.; MARECHAL, A.M.L. Dioxins and dioxin-like persistent organic pollutants in textiles and chemicals in the textile sector. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 79, p.177-186, 2006.

KUČEROVÁ, M.; POLIVKOWI, Z.; GREGOR, V.; DOLANSKÁ, M.; MÁLEK, B.; KLIMENT, V.; ŽDÁRSKÝ, E.; MAROUŠKOVÁ, A.; NOVÁKOVÁ, J. The possible mutagenic effect of the occupation of TV announcer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 192, n. 1, p. 59-63, 1987.

KUSIC, H.; JURETIC, D.; KOPRIVANAC, N.; MARIN, V.; BOŽIĆ, A.L. Photooxidation processes for an azo dye in aqueous media: Modeling of degradation kinetic and ecological parameters evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, n. 2-3, p. 1558-1568, 2011.

LEPERA, J.S. Agentes Metemoglobinizantes in: **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2008, cap. 3.2, p. 261-274, ed. Terceira

LIMA, P.L.A.; RIBEIRO, L.R. Teste de mutação gênica em células de mamífero (*mouse lymphoma assay*) in: **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora ULBRA, 2003, cap. 5, p. 113-150, ed. primeira.

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**, Amsterdam, v. 626, n. 1-2, p. 53-60, 2007.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.

LIZIER, T.M. **Ocorrência de Aminas Aromáticas como subprodutos da degradação dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9**: UNESP, 2009. 201 páginas. Dissertação (mestrado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

MA, H.; WANG, J.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; BOOR, P.J.; KHAN, M.F. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 233, n. 2, p. 247-253, 2008.

MAAS, R.; CHAUDHARI, S. Adsorption and biological decolorization of azo dye reactive red 2 in semicontinuous anaerobic reactors. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 699-705, 2005.

MANSOUR, H.B.; CORROLER, D.; BARILLIER, D.; GHEDIRA, K.; CHEKIR, L.; MOSRATI, R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 9, p.1670-1677, 2007.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v. 10, n. 4-5, p. 392-413, 2007.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 173-214, 1983.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

McCLAIN, R.M.; WOLZ, E.; DAVIDOVICH, A.; BAUSCH, J. Genetic toxicity studies with genistein. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 42-55, 2006.

McLAFFERTY, F.W.; TURECEK, F. Interpretation of massa spectra. 4a. Ed. University Science Books: EUA, 1993, p.371.

MOORE, M.M.; COLLARD, D.D.; HARRINGTON-BROCK, K. Failure to adequately use positive control data leads to poor quality mouse lymphoma data assessments. **Mutagenesis**, Oxford, v.14, n. 3, p. 261-263, 1999.

MOORE, M.M.; HONMA, M.; CLEMENTS, J.; BOLCSFOLDI, G.; CIFONE, M.; DELONGCHAMP, R.; FELLOWS, M.; GOLLAPUDI, B.; JENKINSON, P.; KIRBY, P.; KIRCHNER, S.; MUSTER, W.; MYHRE, B.; O'DONOVAN, M.; OLIVER, J.; OMORI, T.; OULDELHKIMM, M.C.; PANT, K.; PRESTON, R.; RIACH, C.; SAN, R.; STANKOWSKI, L.F.; E, THAKUR, A.; WAKURI, S.; YOSHIMURA, I. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup Report—Plymouth, UK 2002. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 540, n. 2, p. 127-140, 2003.

MOORE, M.M.; HONMA, M.; CLEMENTS, J.; BOLCSFOLDI, G.; BURLINSON, B.; CIFONE, M.; CLARKE, J.; DELONGCHAMP, R.; DURWARD, R.; FELLOWS, M.; GOLLAPUDI, B.; HOU, S.; JENKINSON, P.; LLOYD, M.; MAJESKA, J.; MYHR, B.; O'DONOVAN, M.; OMORI, T.; RIACH, C.; SAN, R.; STANKOWSKI, L.F. JR.; THAKUR, A.K.; VAN GOETHEM, F.; WAKURI, S.; YOSHIMURA, I. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing--Aberdeen, Scotland, 2003--Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 47, n. 1, p. 1-5, 2006.

MOORE-BROWN, M.M.; CLIVE, D.; HOWARD, B.E.; BATSON, A.G.; JOHNSON, K.O. The utilization of trifluorothymidine (TFT) to select for thymidine kinase-deficient (TK^{-/-}) mutants from L5178Y/TK^{+/-} mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 85, n. 5, p. 363-378, 1981.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

NAM, S.; RENGANATHAN, V. Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH, **Chemosphere**, Oxford, v. 40, n. 4, p.351-357, 2000.

NESTMANN, E.R.; KOWBEL, D.J.; WHEAT, J.A. Mutagenicity in *Salmonella* of dyes used by defence personnel for the detection of liquid chemical warfare agents. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 2, n. 9, p. 879-883, 1981.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent— Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 626, n. 1-2, p. 135-142, 2007.

OSUGI, M.E.; RAJESHWAR, K.; FERRAZ, E.R.A.; OLIVEIRA, D.P.; ARAÚJO, 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**, Amsterdam, v. 54, n. 7, p. 2086-2093, 2009.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Review: Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 59, n. 2, p. 73-84, 2007.

PERCY, A.J.; MOORE, N.; CHIPMAN, J.K. Formation of nuclear anomalies in rat intestine by benzidine and its biliary metabolites. **Toxicology**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 217-223, 1989.

PHILLIPSON, C.E.; IOANNIDES, C. Activation of aromatic amines to mutagens by various animal species including man. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 325-336, 1983.

PIELESZ, A. The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 511-512, n. 23, p. 337-344, 1999.

PIELESZ, A.; BARANOWSKA, I.; RYBAK, A.; WŁOCHOWICZ, A. Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 53, n. 1, p. 42-47, 2002.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I. in: Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds.), *Mutagênese Ambiental*, Editora da ULBRA, 2003, cap. 2.

PINHEIRO, H.M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 61, n. 2, p. 121-139, 2004.

PRIVAL, M.J.; MITCHELL, V.D. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 103-116, 1982.

RAFII, F.; HALL, J. D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 897-901, 1997.

RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L.J.; ASHBY, J.; WILLINGTON M.A.; TURNER,S.; WOOLFORD, L.A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J.A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 444, n. 1, p. 175-180, 1999.

REID, T. M.; MORTON, K. C.; WANG, C. Y.; KING C. M. Conversion of Congo red and 2-azoxyfluorene to mutagens following *in vitro* reduction by whole-cell rat cecal bacteria. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 117, p. 105-112, 1983.

RESS, N.B.; WITT, K.L.; XUC, J.; HASEMANA, J.K.; BUCHER, J.R. Micronucleus induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 521, n. 1-2, p. 201-208, 2002.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.

SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S. & GOVINDWAR, S.P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 1, p. 138-157, 2011.

SAUPE, A. High-rate biodegradation of 3- And 4-Nitroaniline. **Chemosphere**, Oxford, v. 39, n. 13, p. 2325-2346, 1999.

SAWYER, J.; MOORE, M.M.; CLIVE, D.; HOZIER, J. Cytogenetic characterization of the L5178Y TK ⁺/₋ 3.7.2C mouse lymphoma cell line. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 5, p. 243-253, 1985.

SEESURIYACHAN, P.; TAKENAKA, S.; KUNTIYA, A.; KLAYRAUNG, S.; MURAKAMI, S.; AOKI, K. Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. **Water research**, New York, v. 41, n. 5, p. 985-992, 2007.

SHARGEL, L.; MAZEL, P. Influence of 2,4-dichloro-6-phenoxyethyl-amine (DPEA) and -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate (SKF-525A) on hepatic microsomal azoreductase activity from phenobarbital or 3-methylcholanthrene induced rats. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 69-75, 1972.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, Oxford, v. 22, n.1-2, p. 107-119, 1991.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Espectrometria de massas in: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, cap. 2, p. 3-36, ed. Quinta.

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: 20 Out. 2010.

SOFUNI, T.; WILCOX, P.; SHIMADA, H.; CLEMENTS, J.; HONMA, M.; CLIVE, D.; GREEN, M.; THYBAUD, V.; SAN, R.H.; ELLIOTT, B.M.; MÜLLER, L. Mouse lymphoma workshop: Victoria, British Columbia, Canada, March 27, 1996 protocol issues regarding the use of the Microwell Method of the Mouse Lymphoma Assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 29, n. 4, p. 434-438, 1997.

SORIANO, C.; CREUS, A.; MARCOS, R. Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, p. 40-50, 2007.

STAHLMANN, R.; WEGNER, M.; RIECKE, K.; KRUSE, M.; PLATZEK, T. Sensitising potential of four textile dyes and some of their metabolites in a modified local lymph node assay. **Toxicology**, Amsterdam, v. 219, n. 1-3, p. 113-123, 2006.

SWEENEY, E.A.; CHIPMAN, J.K.; FORSYTHE, S.J. Evidence for Direct-acting Oxidative Genotoxicity by Reduction Products of Azo Dyes. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle, v. 102, n. 6, p. 119-122, 1994.

TÁRRAGA, C.S. **Utilidad del ensayo de linfoma de ratón em La determinación de los mecanismos de genotoxicidad Del arsênico. Espectro mutacional del trióxido de arsênico**: UAB, 2009. 170 páginas. Tese de doutorado. Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona – Espanha, 2009.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 21, n. 8, p. 1650-1655, 2007.

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.; 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**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 55-64, 2005a.

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**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 49-56, 2005b.

VAN DER ZEE, F.P.; VILLAVERDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes — A short review of bioreactor studies. **Water Research**, New York, v. 39, n. 8, p. 1425-1440, 2005.

VENTURINI, S.; TAMARO, M. Mutagenicity of anthraquinone and azo dyes in Ames' *Salmonella typhimurium* test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 307-312, 1979.

WATANABE, T.; HIRAYAMA, T.; FUKUI, S. The mutagenic modulating effect of *p*-phenylenediamine on the oxidation of *o*- or *m*-phenylenediamine with hydrogen peroxide in the *Salmonella* test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 245, n. 1, p. 15-22, 1990.

WALPOLE, A.L.; WILLIAMS, M.H.C. Aromatic amines as carcinogens in industry. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 14, p. 141-145, 1958.

WALKER, R. The Metabolism of Azo Compounds: A Review of the Literature. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 659-676, 1970.

WALKER, R.; RYAN, A.J. Some molecular parameters influencing rate of reduction of azo compounds by intestinal microflora. **Xenobiotica**, London, v. 1, n. 4-5, p. 483-486, 1971.

WATABE, T.; OZAWA, N.; KOBAYASHI, F.; KURUTA, H. Reduction of sulphonated water-soluble azo dyes by micro-organisms from human faeces. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v.18, n. 4, p. 349-352, 1980.

WEISBURGER, J.H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 506–507, p. 9-20, 2002.

YOSHIMI, N.; SUGIE, S.; IWATA, H.; NIWA, K.; MORI, H.; HASHIDA, C.; SHIMIZU, H. The genotoxicity of a variety of aniline derivatives in a DNA repair test with primary cultured rat hepatocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 206, n. 2, p. 183-191, 1988.

ZBAIDA, S.; STODDART, A.M.; LEVINE, W.G. Studies on the mechanism of reduction of azo dye carcinogens by rat liver microsomal cytochrome P-450. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 61-71, 1989.

ZBAIDA, S. The mechanism of microsomal azoreduction-predictions based on electronic aspects of structure-activity-relationships. **Drug Metabolism Reviews**, London, v. 27, p. 497-516, 1995.

ZBAIDA, S. Nitroreductases and Azoreductases in: **Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics**, Guildford-UK: John Wiley & Sons Ltd, 2002, cap. 16, p. 555-566.

ZEIGER, E.; HASEMAN, J.K.; SHELBY, M.D.; MARGOLIN, B.H.; TENNANT, R.W. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 16, n. 18, p. 1-14, 1990.

ZOLLINGER, H. *Colour Chemistry: Synthesis, Properties of Organic Dyes and Pigments*. New York: VCH, 1987, p. 92.

ZOLLINGER, H. *Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments*. 2nd ed. New York: VCH, 1991, p. 496.