

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação eco/genotóxica dos corantes têxteis Reactive Blue
4 e Reactive Blue 15**

Gabriela Meireles

Ribeirão Preto

2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação eco/genotóxica dos corantes têxteis Reactive Blue
4 e Reactive Blue 15**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Gabriela Meireles

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de
Oliveira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Toxicologia em 29/07/2013. A versão original encontra-se disponível
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

RESUMO

MEIRELES, G. Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15. 2013. 90f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Os corantes são amplamente utilizados nas indústrias têxteis, farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, fotográficas, entre outras. Contudo, essas substâncias podem ser tóxicas, mutagênicas e resistentes a muitos processos de degradação utilizados em estações de tratamento. Estima-se que cerca de 15% dos corantes utilizados no mundo sejam perdidos durante o processo de tingimento e lançados no ambiente, atingindo principalmente os corpos d'água. No entanto, apesar da grande quantidade de corantes comerciais disponíveis e da alta quantidade lançada no ecossistema aquático, os estudos sobre a toxicidade dessas substâncias são escassos e pouco se conhece sobre seus efeitos mutagênicos e principalmente ecotoxicológicos. Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a ecotoxicidade, bem como a capacidade dos corantes têxteis Reactive Blue 4 (RB 4) e Reactive Blue 15 (RB 15) de lesar o material genético, empregando ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*, toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, genotoxicidade (Teste do Cometa) com fibroblastos de derme humana e mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*. Adicionalmente, avaliou-se a concentração de cobre em *Ceriodaphnia dubia* expostas ao corante Reactive Blue 15, que possui esse metal na sua estrutura química. O corante RB 4 foi moderadamente tóxico e o corante RB 15 foi relativamente não tóxico para *Daphnia similis*. Ambos corantes reduziram a luminescência de *Vibrio fischeri* em elevadas concentrações, sendo o corante RB 4 mais tóxico para a bactéria quando comparado ao corante RB 15. O corante RB 4 induziu efeito *hormesis* nos ensaios com *C. dubia*, ou seja, houve um estímulo na reprodução nas menores concentrações, seguido por um decréscimo em concentrações mais elevadas, ao passo que, o corante RB 15 reduziu a fecundidade de *C. dubia*. Não houve acúmulo de cobre nos organismos expostos ao corante RB 15. Nenhum dos corantes foram genotóxicos para fibroblastos de derme humana e apenas o corante RB 4 induziu mutagenicidade, por substituição de pares de base. Os resultados obtidos mostram que os corantes podem causar efeitos adversos nos organismos mesmo em baixas concentrações e que o lançamento contínuo dessas substâncias nos corpos d'água é preocupante.

Palavras - chave: Corantes reativos, Mutagenicidade, Ensaio ecotoxicológicos, *Daphnia similis*, *Vibrio fischeri*, *Ceriodaphnia dubia*, *Hormesis*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais tem se tornado cada vez mais frequentes e acentuados (KUNZ et al., 2002). Dentre os compartimentos ambientais afetados pela contaminação e poluição, as águas merecem destaque, visto que são os principais receptáculos dos contaminantes, tanto de forma direta, através de fontes pontuais ou de forma indireta, por processos de migração dos poluentes (COSTA et al., 2008; RAJAGURU et al., 2001). De acordo com Parikh, Shah e Madamwar (2006), 70% dos resíduos industriais gerados são liberados no ecossistema aquático, reduzindo a quantidade e qualidade dos recursos hídricos. Dentre os diferentes setores industriais, o ramo têxtil tem recebido grande atenção devido ao seu elevado potencial poluidor (CÉRON-RIVERA; DÁVILLA-JIMÉNEZ; ELIZALDE-GONZÁLEZ, 2004).

A indústria têxtil tem importante papel na economia mundial. No Brasil há cerca de trinta mil empresas distribuídas por todo território nacional, gerando mais de 1,7 milhões de empregos e com um faturamento anual de US\$ 56,7 bilhões. Com isso, o Brasil se tornou o sexto maior produtor têxtil do mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTEL E DE CONFECÇÃO [ABIT], 2013). Contudo, considerando o volume e composição dos efluentes gerados, a indústria têxtil é a mais poluente dentre todos os setores industriais. Esse setor consome grande quantidade de água (cerca de 150 litros para cada quilo de algodão tingido) e, conseqüentemente, gera enormes volumes de efluentes de composição diversa, variando desde substâncias inorgânicas até orgânicas. Dentre as diferentes substâncias há sais, aditivos, detergentes, surfactantes e principalmente corantes, tornando o tratamento muito difícil (HAI; YAMAMOTO; FUKUSHI, 2006; JADHAV et al., 2010; ROBINSON et al., 2001; ANASTASI et al., 2011). Além disso, dentre as empresas do ramo têxtil presentes no Brasil, uma parte expressiva é de pequeno porte, dificultando a fiscalização (GUARATINI; ZANONI, 2000).

A descarga de efluentes têxteis causa alterações no corpo d'água receptor, principalmente modificações estéticas e redução da qualidade do ambiente. A presença de cor na água reduz a quantidade de luz solar para os organismos fotossintetizantes, resultando em um decréscimo nas concentrações de oxigênio nos ecossistemas aquáticos. Além disso, os corantes e seus produtos de degradação

podem causar efeitos tóxicos aos organismos (CHAMPAGNE; RAMSAY, 2010; KARIYAJJANAVAR; JOGTTAPPA; NAYARA, 2011; KOLEKAR et al., 2012).

Além da aplicação têxtil, os corantes são utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética, de papel, fotográfica, entre outras (GONEN; AKSU et al., 2009; TILLI et al., 2011). Mais de 700.000 toneladas de corantes são consumidas anualmente no mundo, sendo cerca de 26.500 toneladas consumidas apenas no Brasil (KUNZ et al., 2002; SOUZA; FORGIARINI; SOUZA, 2007). Infelizmente, estimam-se que 15% da produção total de corantes sejam perdidas durante a síntese, processamento e utilização dessas substâncias (PEKAKIS et al., 2006). É evidente que o processo de industrialização é importante, contudo a poluição causada pelas indústrias não pode ser negligenciada.

Dentro deste contexto e sabendo de sua ampla utilização na indústria têxtil, no presente trabalho foram avaliados dois corantes têxteis reativos, Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15 (Figura 1). Considerando que os grupos cromóforos podem interferir na toxicidade dos produtos, esses corantes foram escolhidos por apresentarem diferentes grupos cromóforos, sendo esses, antraquinona e cobreftalocianina, respectivamente.

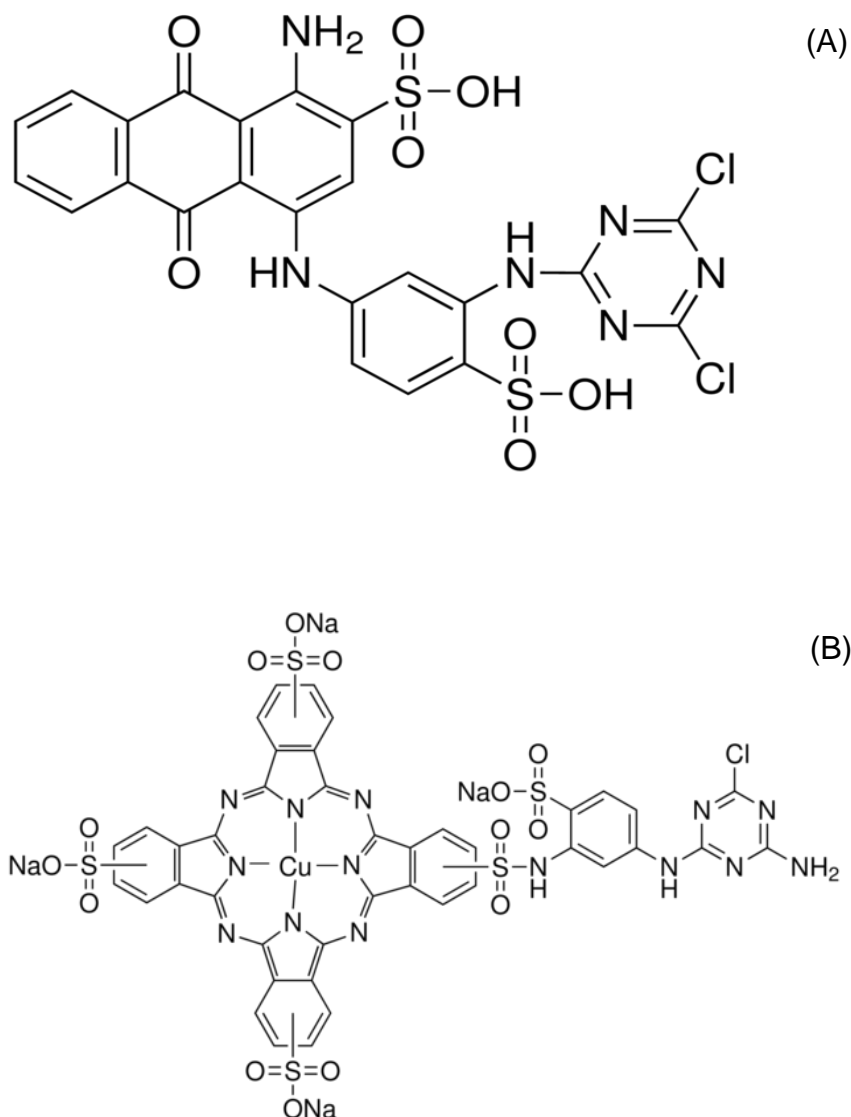


Figura 1. Estruturas químicas dos corantes têxteis estudados no presente trabalho: Reactive Blue 4 (A) e Reactive Blue 15 (B)

Assim, avaliou-se a capacidade desses corantes em lesar o material genético, empregando os ensaios de mutagenicidade com *Salmonella* e Cometa em fibroblastos de derme humana. Além disso, ensaios ecotoxicológicos empregando microcrustáceos e bactéria foram realizados a fim de identificar os efeitos da exposição a estes compostos em organismos aquáticos. Adicionalmente, o corante Reactive Blue 15 foi escolhido por apresentar um átomo de cobre em sua estrutura química e foi utilizado para avaliar a capacidade deste metal em bioacumular-se em organismos aquáticos expostos a esta substância.

1.1 Classificação dos corantes

Os corantes são compostos coloridos que absorvem luz em uma região do espectro visível e são capazes de conferir coloração à diferentes materiais. Eles se prendem ao material por adsorção, solução, retenção ou ligações químicas iônicas ou covalentes (ABIQUIM, 2013; IQBAL, 2008; GUARATINI; ZANONI, 2000).

Existem cerca de 10.000 diferentes corantes empregados industrialmente, a fim de atender às exigências do mercado consumidor que busca diversidade de tons e estabilidade da cor. Essas substâncias são classificadas de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo, ftalocianina, etc) ou de acordo com o método pelo qual é fixado à fibra têxtil (reativos, diretos, azóicos, ácidos, à cuba, pré metalizados e branqueadores) (GUARATINI; ZANONI, 2000). Como já citado, os corantes avaliados neste trabalho são reativos com a estrutura química representada por antraquinona e cobreftalocianina. Assim, maior ênfase será dada à essas classes de corantes.

Os corantes reativos são utilizados no tingimento de algodão, lã e fibras de poliamida. Essa classe deve ser vista com grande atenção, uma vez que apresentam um mercado crescente e dificuldades no tratamento de efluentes gerados, pois são pouco absorvidos por biomassa e não degradados em condições aeróbicas existentes em métodos convencionais empregados nas estações de tratamento (BEYDILLI; PAVLOSTATHIS; TINCHER, 2000; EPOLITO et al., 2008; VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998; WANG et al., 2002). Outra grande preocupação ambiental em relação aos corantes reativos é sua baixa fixação às fibras, o que resulta em grandes perdas durante o banho de tingimento. Em condições típicas, até 50% da concentração inicial dos corantes reativos utilizada no banho pode não se fixar à fibra têxtil, devido a reações paralelas indesejáveis de hidrólise, pois o grupo quimicamente ativo do corante reage com a hidroxila do meio, tornando-o inativo para reação com a hidroxila ou amina da fibra, culminando em uma baixa eficiência de fixação e uma perda de mais de 800 mg/L. Logo, os corantes reativos podem ser facilmente encontrados no ecossistema aquático, afetando a comunidade e contaminando a água utilizada para abastecimento (GOZMEN et al., 2009; GUARATINI; ZANONI, 2000; CARNEIRO et al., 2005; OSUGI et al., 2006, AKSU; ISOGLU, 2006).

Com relação à estrutura química, os corantes mais comuns são aqueles que possuem grupo cromóforo (estrutura química) tipo azo (aproximadamente 70% do total produzido), seguido pelo tipo antraquinona (VANDEVIVERE; BIANCHI;

VERSTRAETE, 1998). Alguns corantes possuem metais na sua estrutura química, como cobre, cromo e cobalto, a fim de melhorar suas propriedades, como estabilidade da cor e ligação do corante com a fibra têxtil.

A toxicidade do corante é dependente da estrutura química e pequenas alterações na molécula podem modificar os efeitos causados, por isso é importante avaliar correta e individualmente cada corante (UMBUZEIRO et al. 2005).

1.2 Toxicidade dos corantes têxteis

Trabalhos científicos têm mostrado o potencial dos corantes têxteis em causar efeitos tóxicos aos organismos (ANASTASI et al., 2011; WANG et al., 2002; SCHNEIDER; HAFNER; JAGER, 2004; CARNEIRO et al., 2010; LIMA et al., 2007; FERRAZ et al. 2011). A exposição humana aos corantes têxteis pode ocorrer através do consumo de água contaminada ou contato com a pele, podendo gerar metabólitos ativos pela ação de microrganismos intestinais ou dérmicos (TSUBOY et al., 2007).

Os corantes reativos são estruturados para reagirem com grupamentos hidroxila e amino das fibras têxteis, porém, esses grupamentos estão presentes em todos os organismos vivos, representado por proteínas e enzimas, por exemplo. Logo, podem interagir com esses compostos endógenos e causarem efeitos tóxicos (VENKATARAMAN ,1974 apud GUARATINI; ZANONI, 2000, p. 06).

Dentre os corantes, aqueles com grupamento azo têm atraído maior atenção, pois a biotransformação dos mesmos pode gerar compostos de elevada toxicidade, como aminas e benzidinas com potencial carcinogênico. Existem milhares de azo corantes disponíveis no mercado e vários deles foram classificados como carcinogênicos. A comunidade europeia banuiu o uso de corantes a base de benzidina desde 2003 (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002). No entanto, países menos desenvolvidos como Brasil, México e Argentina não cessaram completamente a produção de alguns corantes a base de benzidina como o corante Congo Red (GUARATINI; ZANONI, 2000). Essa amina aromática foi detectada em efluentes de indústria têxtil no Brasil, confirmando que este composto ainda está presente nos processos de tingimento (MAZZO et al., 2006). Os efeitos tóxicos de corantes têxteis reportados na literatura referem-se principalmente aos azo corantes, porém outras classes devem ser estudadas, uma vez que, podem desencadear efeitos adversos nos organismos e ambiente. Como exemplo, tem-se o

corante Disperse Blue 1, que possui o grupo cromóforo antraquinona e está diretamente associado ao câncer de bexiga urinária (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2011). Novotný et al. (2006) avaliaram a toxicidade de quatro corantes, dois azo e dois antraquinona, e observaram que o corante antraquinona Disperse Blue 3 foi o mais tóxico para a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapita* e o protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis*, além de induzir efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium*.

Wang et al. (2009) investigaram a toxicidade de 14 derivados de corante do tipo antraquinona e observaram que todos não foram tóxicos para *Daphnia magna* em condições de ausência de luz. No entanto, na presença de luz, 11 dessas substâncias induziram toxicidade aguda ao microcrustáceo.

A adição de metais em corantes pode causar diversos efeitos deletérios ao ecossistema, interferindo no ciclo de vida dos organismos, podendo alterar a reprodução, crescimento e desenvolvimento, além de influenciar no comportamento. Esses efeitos podem modificar as interações biológicas e interferir na dinâmica de populações, podendo causar desequilíbrio ecológico (BAE; FREEMAN, 2007; GONEN; AKSU, 2009; LAWS, 2000). Além disso, os metais são frequentemente encontrados em efluentes têxteis, tanto na forma iônica livre como complexado, aumentando a preocupação ambiental (JADHAV et al., 2010). Eles podem ser assimilados e retidos nos organismos, tanto de forma direta, pelo ambiente, ou de forma indireta, através de alimento contaminado. Nesse caso, os metais são acumulados mais rapidamente que excretados ou detoxificados (KHAN; BURY; HOGSTRAND, 2011). Tais processos podem levar ao acúmulo do contaminante nos organismos e possível biomagnificação, ou seja, os agentes são transferidos de um nível trófico para outro através da alimentação, resultando no aumento da concentração ao longo da cadeia alimentar (BURATINI; BRANDELLI, 2006; GONEN; AKSU, 2009).

Dentre os metais, o cobre é um metal traço essencial para todos os organismos vivos, atuando como cofator em um grande número de atividades enzimáticas, como o transporte de elétrons. No entanto, em elevadas concentrações pode inibir o metabolismo celular, alterar processos bioquímicos e fisiológicos, como síntese protéica, divisão celular, fotossíntese, induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, conduzindo ao dano celular, dentre outros (OCHOA-HERRERA et al., 2011; KHAN; BURY; HOGSTRAND, 2011). Outros estudos também demonstram

que esse elemento é capaz de causar alterações reprodutivas como oligoespermia em animais experimentais (SURYAVATHI et al., 2005).

Existem alguns dados na literatura que sugerem a toxicidade do corante avaliado neste estudo, Reactive Blue 15. Rajaguru et al. (2001) verificaram que esse corante foi capaz de causar dano significativo em eritrócitos de girino e afirmam que o mesmo pode representar um risco para a saúde humana e para organismos aquáticos. Bae e Freeman (2007) avaliaram diferentes corantes diretos complexados com cobre e observaram que todos foram capazes de causar elevada toxicidade em dafinídeos, sugerindo um dano para o ecossistema receptor.

Dentro deste contexto, os corantes Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15 foram avaliados empregando ensaios eco e genotoxicológicos, como serão apresentados a seguir.

1.3 Ensaio ecotoxicológicos

As análises químicas são comumente adotadas no monitoramento da poluição. Parâmetros como oxigênio dissolvido, demanda química e bioquímica de oxigênio, presença de alguns contaminantes, dentre outros são bastante empregados. Entretanto, as análises químicas podem ser limitadas e indicar apenas a natureza dos poluentes, não fornecendo informações sobre seus efeitos biológicos, principalmente frente às misturas complexas (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008). Logo, torna-se fundamental a realização de ensaios ecotoxicológicos, caracterizados como complementos ideais para as análises químicas na identificação e avaliação da toxicidade (MA et al., 1999). Bioensaios mensuram mudanças na fisiologia ou comportamento dos organismos vivos resultantes de estresse induzidos por compostos tóxicos químicos ou biológicos, que podem causar distúrbios no metabolismo (GIROTTI et al., 2008).

Desta forma, os testes ecotoxicológicos são ferramentas muito úteis para identificação de impactos ambientais e o uso destes tem se mostrado uma alternativa importante para a avaliação global da contaminação aquática. Muitos países têm adotado os ensaios biológicos no monitoramento da qualidade da água e há um crescente aumento no interesse de indústrias e governo de utilizarem os bioensaios para determinação da toxicidade de substâncias químicas e efluentes industriais, conduzindo para o desenvolvimento de ensaios mais rápidos, simples,

baratos e com organismos sensíveis (ZHANG et al., 2005; MARTINS; TELES; VASCONCELOS, 2007; MENDONÇA et al., 2009).

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser classificados como agudos ou crônicos, diferindo principalmente na duração e respostas mensuradas. Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos severos, como mortalidade ou imobilidade, sofridos pelos organismos expostos ao agente tóxico por um curto período de tempo, geralmente de 24 a 96 horas. Os efeitos agudos no ambiente aquático podem ser representados por acidentes ambientais ou lançamento de efluentes industriais sem tratamento. Em contrapartida, os ensaios crônicos avaliam os efeitos decorrentes de exposições a concentrações subletais do contaminante por todo ou parte do ciclo de vida do organismo. Esses ensaios possibilitam avaliar os efeitos de concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas podem comprometer funções biológicas. O lançamento contínuo de efluentes tratados representa exposição crônica, pois os organismos estão expostos aos contaminantes por longo período de tempo, mesmo em baixas concentrações (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006; COSTA et al., 2008).

Diferentes organismos podem ser empregados na avaliação da toxicidade. No entanto, é importante apresentar seletividade e sensibilidade constante aos contaminantes, elevada disponibilidade e abundância, estabilidade genética, representatividade no seu nível trófico, importância ambiental e comercial, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório e finalmente a biologia conhecida. Dentre os organismos teste, as algas, crustáceos, peixes e bactérias são mais utilizados e difundidos (COSTA et al., 2008). Neste trabalho, utilizamos microcrustáceos e bactérias como organismo teste.

1.3.1 Ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*

Microcrustáceos zooplancônicos estão entre os grupos mais sensíveis a agentes estressores (GUTIERREZ; PAGGI; GAGNETEN, 2012). Dentre os microcrustáceos, os cladóceros são globalmente utilizados como organismos teste em avaliações ecotoxicológicas, principalmente pelo pequeno tamanho, sensibilidade a várias substâncias tóxicas, reprodução partenogenética, ampla distribuição, elevada densidade e rápido crescimento populacional (SARMA; NANDINI, 2006). *Daphnia* e *Ceriodaphnia* (Crustacea, Cladocera), comumente chamadas de pulga d'água, são organismos filtradores encontrados em ambientes

aquáticos e ocupam uma importante posição na cadeia alimentar, pois constituem uma das principais fontes de alimento para peixes e invertebrados predadores. Além disso, tem importante papel no controle populacional de algas, que podem interferir na qualidade dos corpos d'água (TATARAZAKO; ODA, 2007). Os ensaios de toxicidade mais difundidos mundialmente são testes com os organismos *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, sendo o último organismo mais empregado para ensaios de longa duração (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Muitas espécies do gênero *Daphnia* são empregadas nos ensaios de toxicidade, sendo que *Daphnia magna* é a mais utilizada. No Brasil, a espécie *Daphnia similis* tem sido muito usada nos ensaios de toxicidade aguda. Embora essa espécie não ocorra naturalmente em nosso país, ela é facilmente cultivada sob as condições de laboratório e apresenta sensibilidade muito semelhante à *Daphnia magna* (COSTA et al., 2008; BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004).

Daphnia têm em média de 0,5 a 5,00 mm de comprimento, são organismos filtradores que se alimentam de algas, bactérias e matéria orgânica. A reprodução é partenogenética, originando apenas fêmeas, porém machos podem aparecer devido ao estresse, como falta de alimento, superpopulação ou mudanças ambientais. As fêmeas em condições adversas também podem dar origem a ovos de resistência, denominados efípios e caracterizados pela coloração escura e rigidez (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006). Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* mensuram os valores de concentração que causam efeitos, como a imobilidade, em 50% dos organismos expostos após um período de 24 ou 48 horas (ABNT, 2009).

Ceriodaphnia dubia é um microcrustáceo de regiões temperadas, com 0,8 a 0,9 mm de comprimento e apresenta biologia muito semelhante à *Daphnia*. Ensaios com essa espécie têm sido amplamente utilizados em ensaios de toxicidade crônica, principalmente pela sensibilidade e menor tempo de exposição (7 dias) comparado com *Daphnia* (21 dias) (CONSTANTINE; HUGGETT, 2010; DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006; ABNT, 2010, VERSTEEG et al., 1997). Segundo Shen et al. (2012), *C. dubia* apresenta sensibilidade a uma gama de compostos comparado com outros invertebrados aquáticos e tem sido utilizado mundialmente como um organismo teste para detectar a presença de contaminantes químicos.

Nos ensaios de toxicidade crônica com *C. dubia* é possível mensurar os valores de concentração que causam decréscimo na reprodução, bem como,

estabelecer valores de CENO (Concentração mais elevada da amostra em que não se observa efeito estatisticamente significativo comparado ao controle) e CEO (Concentração mais baixa da amostra que se observa efeitos estatisticamente significativos comparado ao controle) (ABNT, 2010).

1.3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

O ensaio de inibição da luminescência com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* foi proposto em 1979 por Bulich. *V. fischeri* é uma bactéria luminescente gram negativa que tem sido empregada em vários kits comerciais para avaliação da toxicidade, como Microtox, Aboatox, LUMISTox e ToxAlert (BULICH, 1979; PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008).

O ensaio é amplamente utilizado devido à rapidez (5-30 minutos), baixo custo, reprodutibilidade, sensibilidade e baixa quantidade de amostra requerida. A luminescência é produto da respiração celular e processos metabólicos. Substâncias tóxicas podem interagir em diferentes níveis celulares, como membrana celular, cadeia de transporte de elétrons, constituintes citoplasmáticos e essas alterações levam à redução da luminescência de *V. fischeri* que pode ser mensurada. Esse teste é um bom indicador de atividade metabólica e apresenta boa correlação com muitos testes de toxicidade *in vivo* (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008; GIROTTI et al., 2008, BONNET et al., 2008; BRIX et al., 2009; MA et al., 1999; BIZANI et al., 2006; FERRAZ; GRANDO; OLIVEIRA, 2011).

Esse teste pode ser utilizado para mensurar a toxicidade de substâncias puras ou misturas de compostos para todos os tipos de amostras, como águas superficiais, subterrâneas ou efluentes. Embora muitas vezes utilizado para amostras aquosas, é possível empregá-lo também na avaliação de amostras de solo e sedimento (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008). O ensaio de inibição da bioluminescência tem sido utilizado como o primeiro teste em uma bateria de ensaios na avaliação da toxicidade, devido principalmente ao tempo de análise, custo e boa correlação com outros testes empregando algas, crustáceos e peixes, além de auxiliar na identificação de compostos tóxicos para humanos e mamíferos (GIROTTI et al., 2008).

1.4 Genotoxicidade

Os poluentes ambientais podem causar alterações genéticas diretas e indiretas nas populações e resultar num processo denominado “micro-evolução devido à poluição”. As alterações diretas relacionam-se com o dano causado no material genético, como mutações, rearranjos e outros; e as alterações indiretas são resultados de modificações na variabilidade genética (GUARATINI et al., 2008).

Uma substância é dita genotóxica quando é capaz de interagir com o DNA diretamente ou após ativação metabólica, causando danos na estrutura e/ou função da molécula de DNA (WEISBURGER, 1999). Quando ocorre um dano no DNA, a célula interrompe seu ciclo celular e tenta reparar a lesão através do sistema de reparo, presente em todos os organismos. Se houver sucesso no reparo, o ciclo celular prossegue, porém, se houver falhas, a célula pode ser conduzida à senescência, apoptose ou mutação, que pode resultar em carcinogênese (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008). A mutação é uma alteração no material genético que pode ocorrer em células somáticas ou germinativas e que foram transmitidas para as células-filhas ou para a prole, respectivamente, podendo ocorrer de forma espontânea ou induzida por mutágenos e resultar em carcinogênese (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008; BENIGNI; BOSSA, 2011). Esse evento ocorre em todos os seres vivos, atuando no processo de evolução e diversidade das espécies. Contudo, os agentes mutagênicos são capazes de acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que podem acarretar em efeitos deletérios (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

As mutações podem ser cromossômicas ou gênicas. Nas mutações cromossômicas ocorrem alterações estruturais ou numéricas nos cromossomos. As mutações gênicas são consideradas pequenas alterações na sequência do DNA, confinadas em um único gene, são substituições, pequenas adições ou deleções. Esse tipo de mutação também pode ser chamada de mutação de ponto (PRESTON; HOFFMANN, 2012).

1.4.1 Teste do Cometa

O teste do Cometa é um ensaio de genotoxicidade capaz de detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem se tornar mutações. Dessa forma, o ensaio identifica mudanças muito pequenas na estrutura do DNA que podem ser passíveis de correção pelo sistema de reparo. Esse ensaio é considerado uma ferramenta importante na avaliação de compostos genotóxicos, pois é sensível,

rápido, econômico e requer pouca quantidade de células para sua realização. Adicionalmente, pode ser realizado tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que não são necessárias células em divisão para a realização do ensaio como ocorre em outros testes para detecção de danos no DNA, possibilitando o uso de diversos tipos celulares (TICE et al., 2000; SASAKI et al., 1997; GONTIJO; TICE, 2003).

Na década de 80, o ensaio do cometa, também conhecido como SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis*) foi proposto por Ostling e Johanson (1984) e anos depois, Singh et al. (1988) modificaram algumas condições propostas, criando a versão alcalina (solução de eletroforese com $\text{pH} > 13$), possibilitando a detecção de quebra de fita simples, sítio álcali-lábeis no DNA, além das quebras de dupla fitas, já visualizadas com o protocolo inicial (OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988; GONTIJO; TICE, 2003). Outras variações foram inseridas no ensaio, como a adição de enzimas específicas, permitindo que danos como incorporações erradas de uracila, sítios de reparo, ligações cruzadas e outros fossem detectados pelo método (GONTIJO; TICE, 2003).

As células selecionadas para o ensaio do cometa são depositadas numa lâmina com agarose, a membrana é rompida por detergentes e as proteínas nucleares são extraídas por elevada concentração de sais. O DNA das células, devido a sua estrutura, permanece na lâmina como um nucleóide. Em seguida, o material genético é exposto a uma corrente elétrica e conforme o dano, a migração ocorrerá em menor ou maior distância e intensidade. Ao final do ensaio, as lâminas são coradas e as células analisadas em microscopia de fluorescência. A avaliação do dano pode ser quantificada visualmente de acordo com a migração da cauda ou através de análise computacional, podendo analisar parâmetros como tamanho ou intensidade da cauda e *tail moment* (TICE et al., 2000; GONTIJO; TICE, 2003).

1.4.2 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O ensaio de mutagenicidade empregando *Salmonella typhimurium*, também conhecido como teste de Ames, é capaz de detectar mutações gênicas, dentre essas, podemos destacar as substituições e as adições ou deleções de base. Esse ensaio é mundialmente utilizado para determinação do potencial mutagênico de novas drogas e substâncias químicas, devido a sua rápida resposta. Além da curta duração, o ensaio possui alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (61% de acordo com o último estudo

realizado pelo *National Toxicology Program* para 446 compostos) (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL [SBMCTA], 2004). Esse ensaio também é bastante empregado para amostras ambientais, como ar, água, resíduos, solos e sedimentos (JARVIS et al., 1996).

As linhagens de *Salmonella* utilizadas no teste de Ames pertencem ao grupo de Enterobacterias capazes de produzir azo e nitroredutases (UMBUZEIRO et al., 2005). Essas linhagens apresentam mutações nos genes responsáveis pela biossíntese de histidina e conseqüentemente não conseguem sintetizar esse aminoácido. Dessa forma, outra mutação é necessária para que as bactérias consigam crescer na ausência do referido aminoácido. Esse evento ocorre quando os organismos são expostos a agentes mutagênicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Cada linhagem apresenta sensibilidade específica para classes de mutágenos. Desse modo, a combinação delas permite identificar diversos agentes que podem interagir com o DNA (BENIGNI; BOSSA, 2011). As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para a triagem de amostras e são capazes de detectar compostos que causam deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de base, respectivamente. As linhagens YG1041 e YG1042 são derivadas das linhagens TA98 e TA100, respectivamente, e apresentam elevada quantidade das enzimas nitro e acetiltransferase, aumentando a sensibilidade para derivados nitro de compostos orgânicos (HAGIWARA et al., 1993).

Algumas substâncias precisam ser metabolizadas para apresentarem atividade mutagênica. Em humanos e animais superiores o sistema de oxidação metabólica citocromo P450 é capaz de biotransformar diversos compostos, que por sua vez, podem reagir com o DNA. Contudo, bactérias não possuem essa capacidade metabólica. Logo, é importante mimetizar esse sistema nos ensaios com bactérias, através da adição de sistema de metabolização exógena (mistura S9) (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Cada linhagem de *Salmonella typhimurium* apresenta diferentes características genéticas. As linhagens selecionadas neste estudo estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas nos ensaios de mutagenicidade deste trabalho

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	hisD3052 ¹ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵	Deslocamento do quadro de leitura	Maron e Ames (1983)
TA100	hisG46 ⁶ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵	Substituição de pares de base	Maron e Ames (1983)
YG1041	hisD3052 ¹ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵ ; alta produção de nitroreductase e acetiltransferase (pYG233) (Cn ^r) ⁷	Deslocamento do quadro de leitura	Hagiwara et al. (1993)
YG1042	hisG46 ⁶ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵ ; alta produção de nitroreductase e acetiltransferase (pYG233) (Cn ^r) ⁷	Substituição de pares de base	Hagiwara et al. (1993)

¹ mutação responsável pela síntese de histidina

² permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

³ dependência à biotina

⁴ deleção do gene uvrB

⁵ resistência a ampicilina

⁶ mutação responsável pela síntese de histidina

⁷ resistência a canamicina

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

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

- O corante Reactive Blue 4 foi mais tóxico para *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* quando comparado ao corante Reactive Blue 15;
- Reactive Blue 4 foi classificado como moderadamente tóxico e RB 15 como relativamente não tóxico para *Daphnia similis*;
- Ambos corantes foram capazes de reduzir a bioluminescência de *Vibrio fischeri* em elevas concentrações;
- O ensaio com *Daphnia similis* se mostrou mais sensível que o teste com *Vibrio fischeri* para os corantes e endpoints avaliados;
- Reactive Blue 4 induziu efeito *hormesis*, ou seja, houve um estímulo na reprodução de *C. dubia* nas menores concentrações, seguido por um decréscimo em concentrações mais elevadas;
- Reactive Blue 15 reduziu a fecundidade de *Ceriodaphnia dubia*;
- Não houve acúmulo de cobre em *Ceriodaphnia dubia* expostas a concentrações crescentes do metal presente na estrutura do corante Reactive Blue 15, provavelmente devido à autoregulação da concentração de cobre em seu organismo;
- Ambos corantes não foram genotóxicos para fibroblastos de derme humana nas condições testadas;
- O corante Reactive Blue 4 foi capaz de induzir substituição de pares de base em *Salmonella typhimurium* e a metabolização exógena (S9) possivelmente gerou produtos mais reativos com DNA para a linhagem de *Salmonella* TA 100;
- A elevada produção de nitroredutases e acetiltransferases presentes nas linhagens de *Salmonella* YG1041 e YG1042 não alterou a toxicidade dos corantes Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15 e
- Os corantes podem causar efeitos adversos nos organismos e o lançamento contínuo dessas substâncias nos corpos d'água é preocupante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, N.; GONÇALVES, F. The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. **Acta Oecologica**, v. 24, p. 245-249, 2003.
- AKSU, Z.; ISOGLU, I. A. Use of agricultural waste sugar beet pulp for the removal of Gemazol turquoise blue-G reactive dye from aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 418-430, 2006.
- AMIARD, J. C. et al. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 106, p. 73-89, 1987.
- AN, Y. et al. Sudan I induces genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 627, p. 164-170, 2007.
- ANASTASI, A. et al. Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes. **New Biotechnology**, v. 29, p. 38-45, 2011.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**, São Carlos: Rima Editora, 2006, p. 117-152.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/sobre-o-produto>>. Acesso em: 29 de maio de 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). Disponível em: <<http://www.abit.org.br/Abit.aspx#4>>. Acesso em: 27 de maio de 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática- Toxicidade aguda- Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009. 23 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática- Toxicidade crônica- Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2010. 18 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3**: Ecotoxicologia aquática-Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2012. 23 p.

AZUR ENVIRONMENTAL, 1998. Microtox Acute Toxicity Test. Disponível em: <http://www.coastalbio.com/images/Acute_Overview.pdf>. Acesso em 08 de maio de 2013.

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

BARATA, C. et al. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents. **Science of the Total Environment**, v. 405, p. 78-86, 2008.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 2507-2536, 2011.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p.267-281, 1982.

BERVOETS, L. et al. Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. **Environmental Pollution**, v. 91, p. 333-341, 1996.

BEYDILLI, I. M.; PAVLOSTATHIS, S. G.; TINCHER, W. C. Biological decolorization of the azo dye Reactive Red 2 under various oxidation–reduction conditions. **Water Environment Research**, v. 72, p. 698–705, 2000.

BIZANI, E. et al. Photocatalytic decolorization and degradation of dye solutions and wastewaters in the presence of titanium dioxide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 85-94, 2006.

BONNET, J. L. et al. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 576-583, 2008.

BORGMANN, U.; NORWOOD, W. P.; CLARKE, C. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. **Hydrobiologia**, v. 259, p. 79-89, 1993.

BOSSUYT, B. T. A.; JANSSEN, C. R. Copper regulation and homeostasis of *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: influence of acclimation. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 135-144, 2005.

BRIX, R. et al. Identification of disinfection by-products of selected triazines in drinking water by LC-Q-ToF-MS/MS and evaluation of their toxicity. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, p. 330-337, 2009.

BULICH, A. A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In MARKINGS, L. L.; KIMERLE, R. A. **Aquatic Toxicology**. STP 667 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1979, p. 98-106.

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

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Rima, 2006, p. 55-88.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 73-81, 2011.

CARNEIRO, P. A. et al. Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 694-699, 2010.

CARNEIRO, P. A. et al., Evaluation of different electrochemical methods on the oxidation and degradation of Reactive Blue 4 in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 59, p. 431-439, 2005.

CERÓN-RIVERA, M.; DÁVILA-JIMÉNEZ, M. M.; ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P. Degradation of the textile dyes Basic yellow 28 and Reactive black 5 using diamond and metal alloys electrodes. *Chemosphere*, v. 55, p. 1-10, 2004.

CHAMPAGNE, P. P.; RAMSAY, J. A. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2230-2235, 2010.

CHAPMAN, P. M. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, p. 499-505, 2001.

CHAPMAN, P. M.; WANG, F. Issues in ecological risk assessment of Inorganic Metals and Metalloids. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 6, p. 965-988, 2000.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Carlos: Rima e São Paulo: Intertox, 2003, p. 127-165.

CHEN, X. D. et al. Mixture effects of the nonyl phenylpolyethoxylate, R-11 and the insecticide, imidacloprid on population growth rate and other parameters of the crustacean, *Ceriodaphnia dubia*. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 73, p. 132-137, 2010.

COELHO, K. S.; ROCHA, O. Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 812-818, 2010.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **L5.227**: Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio. São Paulo, 2001. 13 p.

CONSTANTINE, L. A.; HUGGETT, D. B. A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Chemosphere**, v. 80, p. 1069-1074, 2010.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

COWGILL, U. M. Critical analysis of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproducibility of toxicity test results. **Water Research**, v. 21, p. 1453-1462, 1987.

DE NICOLA, E. et al. Hormetic versus toxic effects of vegetable tannin in a multitest study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 336-344, 2004.

DOMIGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Rima, 2006, p. 153-184.

EPOLITO, W. J. et al. Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive Blue 4. **Dyes and Pigments**, v. 67, p. 35-46, 2005.

EPOLITO, W. J. et al. Kinetics of zero-valent iron reductive transformation of the anthraquinone dye Reactive Blue 4. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, p. 594-600, 2008.

FERRÃO-FILHO, A. S. et al. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 479-489, 2009.

FERRAZ, E. R. A. et al. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 489-497, 2011.

FERRAZ, E. R.; 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.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GARAJ-VRHOVAC, V.; OREŠČANIN, V. Assessment of DNA sensitivity in peripheral blood leukocytes after occupational exposure to microwave radiation: the alkaline comet assay and chromatid breakage assay. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 33-43, 2009.

GIROTTI, S. et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, p. 2-29, 2008.

GLOBALY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS (GHS). **Part 4: Environmental Hazards**. Disponível em: <http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/English/04e_part4.pdf>. Acesso em: 30 de maio de 2013.

GONEM, F.; AKSU, Z. Single and binary dye and heavy metal bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*: use of response surface methodology (RSM) for the estimation of removal yields. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 1512-1519, 2009.

GONG, P. et al. Toxicogenomic analysis provides new insights into molecular mechanisms of the sublethal toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in *Eisenia fetida*. **Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 8195-8202, 2007.

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. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p. 247-279.

GOTTLIEB, A. et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 49-56, 2003.

GOZMEN, B. et al., Oxidative degradations of reactive blue 4 dye by different advanced oxidation methods. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p. 129-136, 2009.

GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. **Science**, v. 230, p. 674-676, 1985.

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

GUARATINI, T. et al. Ecotoxicologia. In OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008, p. 125-141.

GUTIERREZ, M. F.; PAGGI, J. C.; GAGNETEN, A. M. Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 428-438, 2012.

HAGIWARA, W. et al. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, v. 291, 171-180, 1993.

HAI, F. I.; YAMAMOTO, K.; FUKUSHI, K. Development of a submerged membrane fungi reactor for textile wastewater. **Desalination**, v. 192, p. 315-322, 2006.

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

HAMMERS-WIRTZ, M.; RATTE, H. N. Offspring fitness in daphnia: is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, p. 1856-1866, 2000.

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

HELLMAN, B.; VAGHEF, H.; BOSTROM, B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, p. 123-131, 1995.

IQBAL, MANSOOR. Dyes & Colour. In_ **Textile Dyes**. Karachi: Rahbar Publishers, 2008. p. 01-06.

JADHAV, J. P. et al. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 165-173, 2010.

JARVIS, A.S. et al. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.33, p.193-200, 1996.

KARIYAJJANAVAR, P.; JOGTTAPPA, N.; NAYAKA, Y. A. Studies on degradation of reactive textile dyes solution by electrochemical method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 952-961, 2011.

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

KHAN, F. R.; BURY, N. R.; HOGSTRAND, C. Copper and zinc detoxification in *Gammarus pulex* (L.) **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 822-832, 2012.

KOLEKAR, Y. M. et al. Decolorization and biodegradation of azo dye, Reactive Blue 59 by aerobic granules. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 818-822, 2012.

KOLEKAR, Y. M.; KODAM, K. M. Decolorization of textile dyes by *Alishewanella* sp. KMK6. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 521-529, 2012.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

LAWS, E. A. Metals. In: _ **Aquatic pollution: an introductory text**. 3. ed. New York: Wiley, 2000. p. 351-415.

LEE, J. et al. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1216-1225, 2011.

LIMA, R. O. A. et al. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, p. 53-60, 2007.

LIU, M. C. et al. Toxicity of different industrial effluents in Taiwan: a comparison of the sensitivity of *Daphnia similis* and Microtox. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 93-97, 2002.

LOPES, C. et al. Toxicity of ivermectin on cladocerans: comparison of toxic effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 2160-2166, 2009.

MA, M. et al. Acute toxicity bioassay using the freshwater luminescent bacterium *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov.-Q67. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 247-253, 1999.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; SIVIERO, F. Mutagênese e carcinogênese. In OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008, p. 81-99.

MALACHOVÁ, K. et al. Reduction in the mutagenicity of synthetic dyes by successive treatment with activated sludge and the ligninolytic fungus, *Irpex lacteus*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p.533-540, 2006

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MARTINS, J.; TELES, L. O.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, p. 414-425, 2007.

MAZZO, T. M. et al. Analysis of aromatic amines in surface waters receiving wastewater from a textile industry by liquid chromatographic with electrochemical detection. **Analytical Letters**, v. 39, p. 2671-2685, 2006.

MENDONÇA, E. et al. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 665-670, 2009.

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

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Disperse Blue 1**. National Toxicology Program, 2011. Disponível em <<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/DisperseBlue1.pdf>>. Acesso em 30 de maio de 2013.

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

NOVOTNÝ, C. et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, p. 1436-1442, 2006.

OCHOA-HERRERA, V. et al. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. **Science of the Total Environment**, v. 412-413, p. 380-385, 2011.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Directive 2002/61/EC of the European Parliament and of the Council of 19 July 2002 amending for the nineteenth time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azocolourants)**. Official Journal of the European Communities, 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:243:0015:0018:en:PDF>>. Acesso em 28 de maio de 2013.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

OLIVEIRA, G. A. R. et al. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. **Mutation Research**, v. 703, p. 200-208, 2010.

OSTLING, 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. et al. Photoelectrocatalytic oxidation of Remazol Turquoise Blue and toxicological assessment of its oxidation products. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 871-877, 2006.

PAGNANELLI, F. et al. Bioassessment of a combined chemical-biological treatment for synthetic acid mine drainage. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, p. 567-573, 2008.

PARIKY, A.; SHAH, V.; MADAMWAR, D. Cyanobacterial flora from polluted industrial effluents. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 116, p. 91-102, 2006.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. Toxicity assessment of organic pollutants: Reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri*. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1806-1813, 2008.

PEKAKIS, P. A. et al. Treatment of textile dyehouse wastewater by TiO₂ photocatalysis. **Water Research**, v. 40, p. 1276-1286, 2006.

PRESTON, R. J.; HOFFMAN, G. R. Toxicologia Genética. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012, p. 123-135.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

RAJAGURU, P. et al. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 316-322, 2001.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. C.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003, p. 21-27.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v 77, p. 247-255, 2001.

RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M.; CID, A. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* Straus. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 559-572, 2006.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 22, p. 81-113, 1992.

SANTOS, M. A. P. F.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T. The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). **Ecotoxicology**, v. 17, p. 449-454, 2008.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. C.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003, p. 201 – 223.

SARMA, S. S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 41, p. 1417-1430, 2006.

SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, p. 103-119, 2002.

SCHNEIDER, K.; HAFNER, C.; JAGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, p. 83-91, 2004.

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

SINGH, N. P. et al. Simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton, zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos, Rima, 2001, 106 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL (SBMCTA). **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/microssoma)**. (Série de Documentos, 1). Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2004. Disponível em <http://www.sbmcta.org.br/_img/_documentos/8abf3bb568d1c7ba57cd3fff7a22880c.pdf>. Acesso em: 22 de maio de 2013.

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

STEBBING, A. R. D. A theory for growth hormesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 403, p. 249-258, 1998.

STEINBERG, C. E. W.; STURZENBAUM, S. R.; MENZEL, R. Genes and environment: striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 142-161, 2008.

SURYAVATHI, V. et al. Acute toxicity of textile dye wastewaters (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice. **Reproductive Toxicology**, v. 19, p. 547-556, 2005.

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

TICE, R. et al. Single cell/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TILLI, S. et al., Differential decolorization of textile dyes in mixtures and the join effect of laccase and cellobiose dehydrogenase activities present in extracellular extracts from *Funalia trogii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 465-471, 2011.

TSUBOY, M. S. et al. 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. et al. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 465, p. 11-26, 2000.

UMBUZEIRO, G. A. et al. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the *Salmonella* assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. C.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003, p. 81-112.

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

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, p. 93-109, 2009.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.

VENKATARAMAN, K. The Chemistry of Synthetic Dyes. The Reactive Dyes; Academic Press; New York, Vol. III (1970), Vol. VII (1974). In: GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Textile dyes. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.

VERSTEEG, D. J. et al. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v. 34, p. 869-892, 1997

VILLEGAS-NAVARRO, A. et al. Determination of wastewater LC₅₀ of the different process stages of the textile industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 56-61, 2001.

WANG, C. et al. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs , auxiliaries and select effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. **Chemosphere**, v. 46, p. 339-344, 2002.

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

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

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

WOLLIN, K. M.; GÖRLITZ, B. D. Comparison of genotoxicity of textile dyestuffs in *Salmonella* mutagenicity assay, in vitro micronucleus assay, and single cell gel/comet assay. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, n. 23, p. 267–278, 2004.

ZAGATO, P. A. O uso de substâncias de referência no controle de qualidade de ensaios ecotoxicológicos. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**. São Carlos: Rima, 2006, p. 185-197.

ZALIZNIAK, L.; NUGEGODA, D. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 207-214, 2006.

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

ZHANG, T. et al. Rapid ecotoxicological testing using transformed BF-2 cells incorporating a luminescent reporter gene. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 797-803, 2005.