

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do risco ecogenotóxico
da utilização de corantes têxteis**

Otávio Pelegrino Rocha

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do risco ecogenotoxicológico
da utilização de corantes têxteis**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Me. Otávio Pelegrino Rocha

**Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma
de Oliveira**

Ribeirão Preto
2016

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

Rocha, Otávio Pelegrino

Avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização de corantes têxteis. Ribeirão Preto, 2016.

100 p.: il.;

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Oliveira, Danielle Palma de.

1. Avaliação de risco. 2. Corantes têxteis. 3. Genotoxicidade. 4. Mutagenicidade.
5. *Zebrafish (Danio rerio)*

Folha de Aprovação

Me. Otávio Pelegrino Rocha

Avaliação do risco ecogenotóxicológico da utilização de corantes têxteis

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de
Oliveira

Aprovado em: _____ de _____ de _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimientos

À Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, pela oportunidade a mim concedida e pela contribuição ao meu crescimento científico, intelectual e pessoal durante os anos de convivência.

Ao Klaus e à Sônia, que através dos seus trabalhos no laboratório me ajudaram a executar adequadamente esta pesquisa, e o fácil convívio que me proporcionou ótimos momentos.

Às amigas de laboratório: Camila, Cibele, Flávia, Gabriela, Máira e Tamires, pelas experiências pessoais e profissionais trocadas, pela inestimável ajuda, e pelo carinho do convívio diário.

À Profa. Dra. Regina Célia Garcia de Andrade, pelas oportunidades de realização dos Estágios em Docência e participação em todas as atividades didáticas do seu grupo de pesquisa e ensino, além do carinho e companheirismo ao longo da minha Pós-Graduação.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram para o meu crescimento profissional durante os anos de Doutorado, além do crescimento já existente desde a Graduação (que tenho orgulho de ter realizado nesta Casa), e incluindo todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação da FCFRP-USP, em especial à Rosemary, pela dedicação e paciência.

À Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni e sua equipe do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Araraquara, pela parceria e pela contribuição profissional durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À equipe da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo de Ribeirão Preto (CETESB), que contribuiu na seleção e coleta das amostras ambientais.

Ao Prof. Dr. Enrique Salas Vidal e sua equipe do Instituto de Biotecnología da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por terem me recebido de braços abertos, pela agradável convivência pessoal e profissional, e por todos os conhecimentos adquiridos durante meu estágio.

A todos os meus amigos e amigas, que não citarei nomes, mas que levarei comigo em mente por toda a minha vida, pelo apoio dado durante estes anos vividos em Ribeirão Preto, contribuindo de forma direta e/ou indireta para a realização deste trabalho.

A todos os meus familiares, pela compreensão e apoio durante esta caminhada, além da educação e formação dispensados a mim, mesmo com a distância física existente, servindo de exemplo em muitos aspectos e tendo paciência comigo em muitos momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa (Processo nº. 2013/09317-7).

Epigrafe

“Os corantes são como os pensamentos. Ambos são responsáveis por gerar sensações/sentimentos e estão presentes em nossas vidas a todo instante. Mas não podemos nos esquecer que a falta de cuidados adequados, seja com os corantes, seja com os pensamentos, geralmente vem acompanhada de problemas. No caso dos pensamentos temos as consequências emocionais, no caso dos corantes é a Toxicologia quem irá responder até que ponto estamos nos deixando levar pela vaidade humana e nos perdendo nos caminhos dos desastres ambientais”

Otávio Pelegrino Rocha

Scientia vincet

Resumo

ROCHA, O. P. **Avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização de corantes têxteis**. 2016. 100 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Este trabalho teve como objetivo principal a avaliação do risco ecogenotoxicológico dos corantes *Acid Black 210* e *Disperse Violet 93*, utilizados pelas indústrias têxteis e coureiras nacionais e internacionais. Para atingir este objetivo foi realizada uma abordagem integrada da avaliação da toxicidade utilizando a avaliação da permeabilidade através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA), a avaliação do potencial genotóxico através do Ensaio do Cometa com células HepG2, a avaliação do potencial mutagênico do através do Teste de Ames com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na ausência e na presença de metabolização exógena (mistura S9), a avaliação do potencial embriotóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish (Danio rerio)*, e, por fim, juntando os dados disponíveis na literatura científica, a avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização deste corante têxtil. Devido à observação de ausência de toxicidade nos ensaios realizados e nas informações constantes da literatura científica, não há indícios de que o *Acid Black 210* apresente ecogenotoxicidade, podendo ser considerado seguro à luz dos conhecimentos atuais. Ainda, este trabalho apresenta a avaliação do potencial genotóxico do corante *Disperse Violet 93* através do Ensaio do Cometa e a avaliação do potencial embriotóxico deste corante através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish (Danio rerio)*. Considerando que houve toxicidade morfofisiológica em embriões de *zebrafish* e que na literatura científica também consta sua mutagenicidade em linhagem de *S. typhimurium* YG1041, o *Disperse Violet 93* necessita de avaliações nos demais níveis tróficos para que uma avaliação do risco seja realizada. Para finalizar, este trabalho apresenta a avaliação do potencial embriotóxico de efluente de curtume pré e pós-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish*, onde o efluente pós-tratamento mostrou menor potencial embriotóxico, porém ambos apresentando (mesmo após diluições) coagulação de ovos fertilizados, edema do saco vitelínico, escoliose, má-formação da cauda e má-formação da bexiga natatória. Estes resultados ressaltam a importância da realização de estudos toxicológicos visando fornecer subsídios para a realização de avaliações do risco do uso de corantes, já que estes se encontram em exposição constante aos seres vivos e ao meio ambiente.

Palavras-chave: *Acid Black 210*. Avaliação de risco. Corantes. *Disperse Violet 93*. Efluentes. Toxicologia.

Abstract

ROCHA, O. P. Assessment of the ecogenotoxicologic risk of using textile dyes. 2016. 100 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

This study had as main objective the evaluation of the ecogenotoxicologic risk of the Acid Black 210 and Disperse Violet 93 dyes, used by national and international textile and tanneries industries. To achieve this goal was accomplished an integrated approach to evaluate the risk assessment with the permeability through the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA), the evaluation of the genotoxic potential using the Comet Assay with HepG2 cells, the assessment of the mutagenic potential through the Ames Assay with the *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains in the absence and presence of exogenous metabolism (S9), the evaluation of the embryo-toxic potential through the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Acute Toxicity Test, and, finally, joining the data available in the scientific literature, the evaluation of ecogenotoxicologic risk of using this textile dye. Due to the observation of the absence of toxicity in the testes performed and the information available in the scientific literature, there is no indication that the Acid Black 210 dye has any ecogenotoxicity, and it can be considered safe in the light of current knowledge. Additionally, this study presents the evaluation of the genotoxic potential of the Disperse Violet 93 dye by the Comet Assay and the assessment of embryo-toxic potential of this dye through the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Acute Toxicity Test. Considering the observed morphophysiological toxicity in zebrafish embryos and the mutagenicity in *S. typhimurium* YG1041 strain described by the scientific literature, the Disperse Violet 93 dye needs more studies in other trophic levels to perform its risk assessment. Finally, this study presents the assessment of embryo-toxic potential of effluent pre tannery and aftercare through the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Acute Toxicity Test, where the post-treatment effluent showed less embryo-toxic potential, but both presented (even after dilution) coagulation of fertilized eggs, yolk sac edema, scoliosis, malformation of the tail and malformation of the swim bladder. These results highlight the importance of conducting toxicological studies to provide input data for conducting risk assessments of the use of dyes, as they are in constant exposure to the living organisms and the environment

Keywords: *Acid Black* 210. Disperse Violet 93. Dyes. Effluents. Risk assessment. Toxicology.

Lista de Figuras

Figura 1 – Espectro eletromagnético completo, com destaque para a região visível	27
Figura 2 – Morfologia externa do <i>zebrafish</i> , ressaltando seu padrão típico de listras pretas e brancas ao longo do corpo	36
Figura 3 – Estrutura química do corante <i>Acid Black 210</i>	43
Figura 4 – Estrutura química do corante <i>Disperse Violet 93</i>	44
Figura 5 – Equipamento ZebTech instalado no Laboratório de Toxicologia Ambiental da FCFRP-USP para realização de ensaios de toxicidade aguda com embriões de <i>Danio rerio</i> (esquerda) e Sistema de Reprodução Assistida para a obtenção de embriões de <i>Danio rerio</i> (direita)	54
Figura 6 – Embrião de <i>D. rerio</i> 24 horas pós-fertilização (controle negativo)	55
Figura 7 – Embrião de <i>D. rerio</i> 24 horas pós-fertilização em processo de coagulação (controle positivo 3,4-dicloroanilina 4 mg / L)	55
Figura 8 – Estrutura química do composto mesilato KB-R7943	78

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Efeito do corante <i>Acid Black</i> 210 sobre o DNA de células HepG2, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (<i>tail moment</i>). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. *p < 0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo	62
Gráfico 2 – Efeito do corante <i>Acid Black</i> 210 sobre o DNA de células HepG2, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (<i>tail intensity</i>). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. *p < 0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo	62
Gráfico 3 – Efeito do corante <i>Acid Black</i> 210 sobre embriões de <i>D. rerio</i> após 144 horas de exposição. Os resultados são expressos em porcentagem de ovos afetados de forma cumulativa para cada <i>endpoint</i> analisado	65
Gráfico 4 – Efeito do corante <i>Disperse Violet</i> 93 sobre o DNA de células HaCaT, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (<i>tail moment</i>). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. *p < 0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo	70
Gráfico 5 – Efeito do corante <i>Disperse Violet</i> 93 sobre o DNA de células HaCaT, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (<i>tail intensity</i>). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. *p < 0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo	71
Gráfico 6 – Efeito do corante <i>Disperse Violet</i> 93 sobre embriões de <i>D. rerio</i> após 144 horas de exposição. Os resultados são expressos em porcentagem de ovos afetados de forma cumulativa para cada <i>endpoint</i> analisado	72
Gráfico 7 – Efeito do efluente pré-tratamento sobre embriões de <i>D. rerio</i> após 144 horas de exposição. Os resultados são expressos em porcentagem de ovos afetados de forma cumulativa para cada <i>endpoint</i> analisado	73
Gráfico 8 – Efeito do efluente pós-tratamento sobre embriões de <i>D. rerio</i> após 144 horas de exposição. Os resultados são expressos em porcentagem de ovos afetados de forma cumulativa para cada <i>endpoint</i> analisado	74

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características genéticas das linhagens de <i>S. typhimurium</i> TA98 e TA100 .	50
Tabela 2 – Critérios de confiabilidade do método CRED (MOERMOND et al., 2016)	58
Tabela 3 – Critérios de relevância do método CRED (MOERMOND et al., 2016)	59
Tabela 4 – Efeito do corante <i>Acid Black</i> 210 sobre a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA98 após 66 horas de exposição	63
Tabela 5 – Efeito do corante <i>Acid Black</i> 210 sobre a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA100 após 66 horas de exposição	64
Tabela 6 – Critérios de confiabilidade avaliados para os trabalhos toxicológicos disponíveis na literatura utilizando o corante <i>Acid Black</i> 210	68
Tabela 7 – Critérios de relevância avaliados para os trabalhos toxicológicos disponíveis na literatura utilizando o corante <i>Acid Black</i> 210	69
Tabela 8 – Comparação de padrões de lançamento de efluentes oriundos de atividades de curtume de vários países (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008)	82

Lista de Abreviaturas e Siglas

AB210	<i>Acid Black 210</i>
AFNOR	<i>Association Française de Normalisation</i>
ANOVA	Análise de variância
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BDCP	<i>Black Dye Commercial Product</i>
C.I.	<i>Color Index</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CEE	Comunidade Econômica Europeia
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRED	<i>Criteria for reporting and Evaluating Ecotoxicity Data</i>
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
DV93	<i>Disperse Violet 93</i>
EPA	<i>US Environmental Protection Agency</i>
ETAD	<i>Ecological and Toxicological Association of Dyes</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MIAME	<i>Minimum Information About a Microarray Experiment</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
STROBE	<i>Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology</i>
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 Corantes e sua evolução histórica	26
1.2 A indústria têxtil e coureira nacionais	28
1.3 A problemática da ecogenotoxicidade dos corantes têxteis	29
1.4 Avaliação ecogenotoxicológica	32
1.4.1 Avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa	33
1.4.2 Avaliação da mutagenicidade através do Ensaio com <i>Salmonella typhimurium</i>	35
1.4.3 Avaliação do potencial embrio-tóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de <i>Zebrafish (Danio rerio)</i>	36
1.5 Avaliação da permeabilidade através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)	37
1.6 Avaliação do risco	38
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Amostras em estudo	43
3.2 Ensaio do Cometa	45
3.2.1 Teste de viabilidade celular	47
3.2.2 Soluções utilizadas	47
3.3 Ensaio de mutagenicidade com <i>Salmonella typhimurium</i>	49
3.3.1 Teste de viabilidade celular	51
3.3.2 Soluções utilizadas	51
3.4 Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de <i>Zebrafish (Danio rerio)</i>	53
3.5 Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)	56
3.6 Avaliação do risco ecogenotoxicológico	57
4. RESULTADOS	58
4.1 Avaliações toxicológicas do corante têxtil <i>Acid Black 210</i>	61
4.1.1 Avaliação do potencial genotóxico através do Ensaio do Cometa com células HepG2	61

4.1.2 Avaliação do potencial mutagênico através do Teste de Ames com a linhagem de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	63
4.1.3 Avaliação do potencial mutagênico através do Teste de Ames com a linhagem de <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	63
4.1.4 Avaliação do potencial embrio-tóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)	64
4.1.5 Avaliação da permeabilidade através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)	66
4.1.6 Avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização do corante têxtil <i>Acid Black</i> 210	66
4.2 Avaliações toxicológicas do corante têxtil <i>Disperse Violet</i> 93	70
4.2.1 Avaliação do potencial genotóxico através do Ensaio do Cometa com células HaCaT	70
4.2.2 Avaliação do potencial embrio-tóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)	71
4.2.3 Avaliação do risco ecogenotoxicológico preliminar da utilização do corante têxtil <i>Disperse Violet</i> 93	72
4.3 Avaliação do potencial embrio-tóxico de efluente de curtume pré-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) ...	72
4.4 Avaliação do potencial embrio-tóxico de efluente de curtume pós-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) ...	73
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE A – Resultados de cada experimento do Ensaio do Cometa em células HepG2 para o corante <i>Acid Black</i> 210	96
APÊNDICE B – Resultados de cada experimento do Ensaio do Cometa em células HaCaT para o corante <i>Disperse Violet</i> 93	97
ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto	99
ANEXO B – Artigo relacionado à Tese já aceito para publicação no periódico <i>Toxicology</i> (JCR-2015: 3,817)	100

"O mais difícil não é escrever muito: é dizer tudo, escrevendo pouco."

Júlio Dantas

Introdução

- I -



INTRODUÇÃO

O estudo da toxicologia dos corantes tem como marco inicial o trabalho publicado por Walton e Lawson (1934). Estes autores descreveram a farmacologia e a toxicologia da fenazopiridina, medicamento até hoje utilizado para o alívio da dor decorrente da irritação da mucosa do trato urinário inferior (PFIZER, 2008). A toxicologia dos corantes permaneceu “esquecida” pela comunidade científica até a década de 60, quando a indústria de corantes reconheceu as limitações tecnológicas e científicas que enfrentavam, incluindo os problemas ecotoxicológicos resultantes de suas atividades (ANLIKER, 1979).

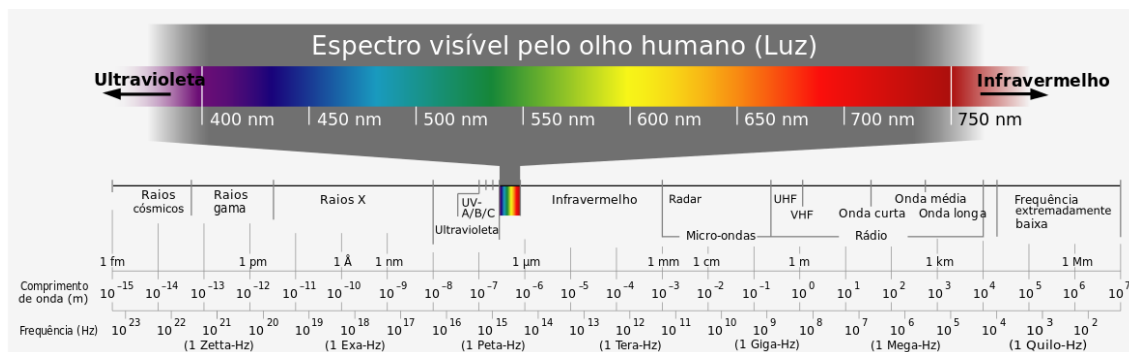
Foi formada, então, a Associação Ecológica e Toxicológica das Indústrias Produtoras de Corantes (ETAD, na sigla em inglês) em 1974, envolvendo empresas da Itália, Índia, Alemanha, Suíça, Japão, Grã-Bretanha, Dinamarca e França, com o objetivo primário de unificar ações que minimizassem possíveis danos ao ambiente provindos do uso e das aplicações de seus produtos, cooperando com as instituições públicas responsáveis pelo controle do impacto ecotoxicológico dos corantes. Em 1977, duas organizações semelhantes foram formadas nos Estados Unidos, uma para a área de corantes (*Dyes Environmental and Toxicology Organization*) e outra para a área de pigmentos (*Dry Color Manufacturers Association*) (ANLIKER, 1979).

Atualmente, os estudos científicos da área são focados na toxicidade intrínseca de cada corante utilizado e na possível contaminação ambiental por estes e por seus produtos de degradação.

1.1 Corantes e sua evolução histórica

Corantes podem ser definidos como substâncias que, quando aplicadas a um substrato, fornecem cor por um processo que altera, pelo menos temporariamente, a estrutura cristalina da substância em questão (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011). A cor depende diretamente da absorção da luz na região visível do espectro de radiação eletromagnética (Figura 1), onde os comprimentos de onda situam-se entre 370 nm (violeta) e 750 nm (vermelho). De acordo com a teoria eletrônica moderna, a cor é gerada pela excitação dos elétrons π na camada de valência pela luz visível (MURRELL, 1963).

Figura 1 – Espectro eletromagnético completo, com destaque para a região visível.



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_vis%C3%ADvel#/media/File:Espectro_eletromagnetico-pt.svg

Até a metade do século XIX todos os corantes provinham de fontes naturais. O primeiro registro sobre a utilização de corantes naturais data de 2.600 anos a.C. na China, porém a história do homem é acompanhada desde o começo pela utilização de corantes, como a fuligem (negro de fumo ou *carvon black*) para a pintura das paredes das cavernas. Os corantes também sempre acompanharam as desigualdades sociais da vida em sociedade. Na Roma Antiga, por exemplo, a cor púrpura obtida de espécies de um molusco do gênero *Murex* era símbolo de riqueza e poder, onde somente o imperador possuía o direito de usá-la nas vestes. O imperador Nero chegou a punir com a morte o seu uso. Essa cor ainda é utilizada atualmente pelo alto clero da Igreja Católica como herança por seu significado histórico (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2016).

O primeiro corante orgânico sintetizado foi a mauveína, em 1856, pelo químico britânico William Perkin através da oxidação da anilina com dicromato de potássio. Outros corantes passaram a ser produzidos, dando origem aos fabricantes de corantes sintéticos na Alemanha, Inglaterra, França e Suíça, suprindo as necessidades das indústrias que fabricavam tecidos, couro e papel. A partir da década de 90, as grandes corporações mundiais implantaram unidades fabris próprias ou em parcerias com fabricantes locais inicialmente na China, na Índia e na Indonésia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2016).

A demanda mundial por corantes e pigmentos orgânicos tem aumentado em 6 % a cada ano, em um mercado com previsão de movimentar aproximadamente US\$ 20 bilhões no ano de 2019. Atualmente, este valor está na faixa dos US\$ 14,5 bilhões (WORLD DYES & ORGANIC PIGMENTS, 2015).

O Brasil também tem sua história diretamente vinculada à utilização de corantes. A começar pelo nome do país, proveniente da madeira pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), fonte natural de corante avermelhado. Durante grande parte do século XIX o Brasil também foi uma das principais fontes do índigo natural provindo da

Indigofera tinctoria. A produção industrial de corantes sintéticos no país foi introduzida após a Primeira Guerra Mundial, e na virada do milênio já supria 60 % da sua demanda doméstica (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Quanto à classificação dos corantes, esta pode dar-se de acordo com sua estrutura química (azo, nitro, nitroso, diarilmetano, dentre outros) ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado ao substrato (ácido, azoico, básico, direto, dispersivos, dentre outros). Para um maior conhecimento das especificidades relacionadas a estas classificações recomendo a leitura na íntegra do artigo “Corantes têxteis” (GUARATINI; ZANONI, 2000).

1.2 A indústria têxtil e coureira nacionais

O setor têxtil representa um dos ramos industriais mais antigos do mundo, sendo um dos precursores da Revolução Industrial. Os povos primitivos já se utilizavam de técnicas de entrelaçamento manual de fibras vegetais produzindo telas grosseiras com diferentes finalidades, incluindo a proteção corporal. Após a década de 50, houve uma grande evolução tecnológica deste setor a partir da incorporação da área química, com mudanças significativas no âmbito produtivo e no comercial (OLIVEIRA, 2013).

Em 2015, o Brasil exportou mais de US\$ 1 bilhão em produtos têxteis e confeccionados, contando com 33 mil empresas formais distribuídas por todo o território nacional, e gerando 1,5 milhões de empregos diretos, além de 8 milhões de empregos indiretos e de efeito renda, dos quais 75 % são de mão de obra feminina. Com isso, o Brasil se tornou o quinto maior produtor têxtil do mundo, com o quarto maior parque produtivo de confecção mundial. Internamente, é o 2º maior empregador da indústria de transformação, perdendo apenas para o conjunto de alimentos e bebidas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO, 2015).

O Brasil ainda é autossuficiente na produção de algodão e referência mundial em moda praia, jeans e *homewear*, tendo crescido também nos segmentos *fitness* e *lingerie*. No Ocidente, é o único país que possui cadeia têxtil completa, desde a produção das fibras (plantação de algodão) até os desfiles de moda, passando por fiações, tecelagens, beneficiadoras, confecções e varejo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO, 2015).

O Brasil também é um dos líderes da indústria coureira mundial. Em reais, o valor exportado de janeiro a abril de 2016 chegou a mais de R\$ 2,6 bilhões, uma alta de 7,1 % em relação aos mesmos meses do ano anterior (CICB, 2016). O salto nas

exportações foi impulsionado pelos novos mercados compradores, que incluem Tailândia, Indonésia e Alemanha, além dos principais e clássicos importadores do couro brasileiro: China, Itália, Hong Kong e Estados Unidos (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014).

Esse posicionamento de excelência provém dos investimentos na área, qualificação dos profissionais envolvidos e desenvolvimento de novas tecnologias. Segundo especialistas, poucos setores da economia brasileira têm a capilaridade e o potencial apresentados pela indústria do couro e peles. Além disso, o investimento em tecnologias mais avançadas permitiu ao Brasil entrar na produção de couro para estofados e couros automotivos, dando início a uma nova era na indústria curtidora brasileira (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014).

A indústria brasileira de couro conta com mais de 300 plantas curtidoras, 2.800 indústrias de componentes para couros e calçados e 120 fábricas de máquinas e equipamentos, gerando mais de 42.000 empregos diretos e movimentando US\$ 3,5 bilhões por ano (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014). Além dos curtumes como unidades autônomas de negócio, tem-se observado uma verticalização dos frigoríficos atuando também como curtidores, sendo que a produção e a indústria de couros localizam-se principalmente no Sul e no Sudeste do país, com destaque para os Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (BRAZILIAN LEATHER BOOK, 2014).

1.3 A problemática da ecogenotoxicidade dos corantes têxteis

A literatura científica conta com diferentes trabalhos que têm mostrado o potencial dos corantes têxteis em causar efeitos tóxicos à saúde humana e ao meio ambiente. A exposição humana a estes corantes pode ocorrer através do consumo de água contaminada ou do contato com a pele, com ou sem a geração de metabólitos ativos pela ação de microrganismos intestinais ou dérmicos (TSUBOY et al., 2007).

Dentre os corantes mais utilizados pelas indústrias têxteis estão os azoicos. Estes provêm de aminas aromáticas diazotizadas acopladas a uma amina ou fenol, com uma ou mais ligações azo (-N=N-) (apud CHEQUER et al., 2013). Considerando que existem mais de 3.000 diferentes azo corantes disponíveis, e que seus efeitos tóxicos estão intimamente relacionados com a natureza e a posição dos substituintes ligados ao grupo azo, há a necessidade de se realizar a avaliação da toxicidade de cada corante individualmente, tendo em vista que pequenas mudanças na molécula podem alterar drasticamente suas propriedades tóxicas (CHUNG; STEVENS; CERNIGLIA, 1992).

Para reforçar a importância e a visibilidade necessárias por esta área da Ciência em nossa sociedade, a Comunidade Europeia banuiu o uso de corantes a base de benzidina desde 2003 (UNIÃO EUROPEIA, 2002), já que estudos em trabalhadores expostos a este composto demonstraram que sua azo-redução no ser humano gera aminas aromáticas responsáveis por causar câncer de bexiga (GOLKA; KOPPS; MYSLAK, 2004). Porém, países como Brasil, Argentina e México não cessaram completamente a produção de alguns corantes a base de benzidina (GUARATINI; ZANONI, 2000). Essa amina aromática foi detectada em efluentes de indústrias têxteis brasileiras, confirmando que este composto ainda está presente nos processos de tingimento (MAZZO et al., 2006).

Ainda, o Regulamento nº 552/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho das Comunidades Europeias, relativo ao registro, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH), diz que todos os corantes azóicos sintetizados a partir de aminas aromáticas carcinogênicas devem ser banidos de curtumes e indústrias têxteis (UNIÃO EUROPEIA, 2009). O Regulamento classifica 22 aminas aromáticas como carcinogênicas em seu Anexo XVII, porém estudos inconclusivos e/ou ausentes na literatura ainda motivam a comunidade científica a continuar testando a toxicidade de corantes não-regulamentados (BRÜSCHWEILER et al., 2014).

No Estado de São Paulo, o controle da poluição está previsto na Lei nº 997/76, já devidamente regulamentada (SÃO PAULO, 1976). Outras exigências relativas aos serviços de água e esgoto, bem como à qualidade dos corpos d'água receptores estão descritas nas Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/05 (BRASIL, 2005) e nº 430/11 (BRASIL, 2011). Porém, não há legislação específica no Brasil para o descarte de corantes em efluentes de indústrias têxteis.

Por outro lado, o processo de tingimento é altamente poluidor, gerando entre 10 a 50 % de perda de corantes para o meio ambiente (VAIDYA; DATYE, 1982), além de utilizar entre 30 a 50 litros de água para a coloração de cada quilograma de fio, dependendo do tipo de corante utilizado (KANT, 2012). Assim, milhões de litros de água contaminada são devolvidos diariamente aos rios, já que o volume total de efluente líquido gerado pelas indústrias é similar ao total de água captada (PACHECO, 2005). Cabe lembrar que estes efluentes também são constituídos por sais, detergentes, surfactantes, metais e outros aditivos, o que torna o tratamento muito difícil (JADHAV et al., 2010).

O grupo de pesquisa envolvido no presente estudo participou do Projeto Temático da FAPESP intitulado "Avaliação da Ocorrência, Toxicidade/Genotoxicidade e Processos para Degradação de Corantes em Efluentes e Águas Superficiais" (Processo nº. 2008/10449-7), realizando um amplo estudo de diversos corantes, desde

sua ocorrência em amostras ambientais até a identificação dos efeitos tóxicos e determinação de seus mecanismos de ação, com especial destaque aos efeitos ecogenotóxicológicos. Dentro deste contexto, este grupo detectou a presença do corante *Acid Black 210* em amostras superficiais coletadas no Córrego do Liso, que recebe efluentes de um curtume localizado na cidade de São Sebastião do Paraíso (MG). Este corante é o principal composto utilizado para conferir cor preta a couros (ZHRIM; TIZAOUI; HILAL, 2010). Porém, não há dados suficientes sobre o potencial genotóxico deste corante na literatura científica, além de não haver estudos relacionados ao seu monitoramento em águas superficiais.

Um levantamento bibliográfico realizado em 15 de agosto de 2016 utilizando a base de dados *Web of Science*TM v.5.22.3 com o termo “*Acid Black 210*” apontou 20 artigos publicados. Destes, 4 artigos descrevem métodos de uso alternativo deste corante para que haja uma maior fixação do mesmo aos tecidos, diminuindo a quantidade descartada através dos efluentes, e 16 artigos estão relacionados ao tratamento do efluente para que haja a decomposição do corante, sendo que metade dos artigos apresenta como foco somente a descoloração das amostras e apenas um deles se preocupou em propor a via de degradação metabólica do corante *Acid Black 210* através da bactéria *Providencia* sp SRS82, seguido de estudos preliminares de toxicidade do corante e dos metabólitos encontrados (AGRAWAL et al., 2014).

Pesquisadores da Seção de Riscos Toxicológicos e Nutricionais do Departamento Federal de Saúde Pública da Suíça publicaram recentemente um artigo científico identificando aminas aromáticas de importância toxicológica não-regulamentadas geradas por clivagem de azo corantes utilizados em indústrias têxteis. Neste artigo, o *Acid Black 210* é citado como um dos corantes responsáveis pela formação de 4-nitroanilina, classificada como possível carcinógeno humano, e ácido 4-aminobenzeno sulfônico, classificado como possível causador de sensibilização por contato com a pele humana (BRÜSCHWEILER et al., 2014).

Em pesquisa realizada por Umbuzeiro et al. (2005), amostras coletadas no Ribeirão dos Cristais (SP) foram testadas para os corantes *Disperse Blue 373*, *Disperse Violet 93* e *Disperse Orange 37* utilizando as linhagens YG1041 derivadas de *Salmonella typhimurium* TA98, porém com superprodução de nitrorredutases e acetiltransferases. Estes três corantes são os componentes principais do produto comercial *Black Dye Commercial Pruduct* (BDCP), e apresentaram atividade mutagênica bem mais alta com a linhagem YG1041 em relação à sua parental, o que denota que a mutagenicidade ocorreu devido aos produtos gerados após a biotransformação enzimática. Análises químicas apontaram para a contribuição do *Disperse Blue 373* em 55 % para a atividade mutagênica observada no lodo da

estação de tratamento da água para consumo humano localizada a aproximadamente 6 Km do descarte de resíduos de corantes de uma indústria têxtil.

A literatura científica não descreve a contribuição do corante *Disperse Violet 93* para esta atividade, nem a avaliação do risco do seu uso pelas indústrias têxteis, já que havia a necessidade da purificação deste corante antes que novos estudos de toxicológicos fossem realizados. Esta purificação foi realizada recentemente pela Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (UNICAMP) (dados não divulgados até o momento). Assim, o presente estudo visa preencher a lacuna científica sobre a avaliação do risco do uso dos corantes *Acid Black 210* e *Disperse Violet 93* pelas indústrias têxteis.

1.4 Avaliação ecogenotóxica

Os ensaios ecotoxicológicos complementam as análises químicas comumente adotadas na monitoração da poluição ambiental com o objetivo de identificar e avaliar a toxicidade observada e os impactos ambientais (MA et al., 1999). A classificação destes ensaios geralmente se divide entre agudos e crônicos, diferenciando-se principalmente quanto à duração e às respostas mensuradas.

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos severos (mortalidade e imobilidade) sofridos pelos organismos expostos ao agente tóxico por um curto período de tempo, geralmente de 24 a 96 horas. Estes efeitos representam, no ambiente aquático, os acidentes ambientais ou lançamento de efluentes industriais sem tratamento. Em contrapartida, os ensaios de toxicidade crônica avaliam os efeitos decorrentes de exposições a concentrações subletais do contaminante por todo o (ou uma boa parte do) ciclo de vida do organismo. Estes efeitos possibilitam avaliar os efeitos de concentrações do agente tóxico que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que podem comprometer suas funções biológicas, como por exemplo, no caso do lançamento contínuo de efluentes tratados (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006; COSTA et al., 2008).

Diferentes organismos podem ser utilizados na avaliação da toxicidade. No entanto, é importante que haja seletividade e sensibilidade constantes ao agente tóxico, elevada disponibilidade e abundância, além de estabilidade genética, representatividade no seu nível trófico, importância ambiental e/ou comercial, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, e biologia conhecida. Dentre os organismos testes as bactérias, as algas, os crustáceos e os peixes são os mais utilizados (COSTA et al., 2008).

Os poluentes ambientais também podem causar alterações genéticas diretas e/ou indiretas nas populações, resultando em um processo denominado “microevolução devido à poluição”. As alterações diretas relacionam-se com o dano causado no material genético, como mutações ou rearranjos; já as alterações indiretas são resultados de modificações na variabilidade genética (apud GUARATINI et al., 2008).

Uma substância é dita genotóxica quando é capaz de interagir com o DNA diretamente ou após biotransformação, causando danos na estrutura e/ou função da molécula de DNA (WEISBURGER, 1999). Após o dano, a célula interrompe seu ciclo celular e tenta reparar a lesão através dos sistemas de reparo, presente em todos os organismos. Caso estes sistemas falhem, a célula pode ser conduzida à senescência, apoptose ou mutação, podendo iniciar o processo de carcinogênese (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008). Embora as mutações possam ocorrer espontaneamente, os agentes mutagênicos são capazes de acelerar ou aumentar seus surgimentos, com maior possibilidade de ocorrência de efeitos deletérios (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

As mutações podem ser cromossômicas ou gênicas. Nas primeiras, ocorrem alterações estruturais ou numéricas nos cromossomos. Já nas segundas ocorrem pequenas alterações na sequência do DNA, confinadas em um único gene, principalmente por substituições, adições ou deleções de pares de bases nitrogenadas (mutações de ponto) (PRESTON; HOFFMANN, 2012).

1.4.1 Avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa

Um recente estudo bibliométrico realizado pela base de dados Pubmed com temas relacionados ao “*Comet assay*” entre os anos 1990 e 2013 apontou a publicação de 509 artigos por autores brasileiros, dentre os 7.674 artigos totais encontrados. Ainda, uma análise comparativa entre palavras-chave possibilitou visualizar a importância deste ensaio para a área de “Saúde Pública e Ambiental” através da observação de alguns termos relacionados, como “Contaminante de Águas” (338 artigos) e “Monitoramento Ambiental” (299 artigos) (NERI et al., 2015), focos do presente estudo.

O Ensaio do Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas, como por exemplo o baixo custo, a alta sensibilidade e a fácil execução, além da flexibilidade quanto aos tipos de células que podem ser utilizadas. Este ensaio não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que podem resultar em mutação (GONTIJO; TICE, 2003).

O comportamento do DNA nas células está relacionado à sua organização dentro do núcleo. Para ser compactado, após o enovelamento com proteínas histônicas, o DNA forma alças de 5-200 Kpb que são aderidas a uma rede protéica ou “matriz celular” (RAZIN; GROMOVA; IAROVAIA, 1995; COOK; BRAZELL, 1976). Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) forem extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo, designada como “nucleoide” (COOK; BRAZELL, 1976). Dentre as poucas proteínas que resistem a esta extração estão as da matriz celular. Portanto, por definição, o nucleoide é uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA a estrutura do nucleoide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (VOGELSTEIN; PARDOLL; COFFEY, 1980; COOK; BRAZELL, 1976).

A aparência de cada nucleoide quando submetido à eletroforese, ou seja, com seu DNA danificado migrando em direção ao ânodo, levou Olive (1989) a sugerir o nome *Comet assay* (Ensaio do Cometa) para identificar o teste que ficou também conhecido pelo nome *Single-Cell Gel (SCG) Assay*. Neste ensaio, para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: “cabeça” e “cauda”. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentariam cauda, permanecendo similares aos nucleoides, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores. Atualmente, o tamanho, intensidade de fluorescência, aspecto e outras características dos cometas são mensurados visualmente por microscopia e *softwares* específicos de análise de imagem (TICE et al., 2000).

Singh et al. (1988) e Olive, Banáth e Durand (1990) introduziram, independente e paralelamente, algumas modificações no protocolo do Ensaio do Cometa, incluindo a alcalinização da solução de lise e de eletroforese. Essas modificações possibilitaram a identificação de quebras de fita simples e sítios álcali lábeis no DNA, além das quebras de fita dupla, já visualizadas com os protocolos de Östling e Johanson (1984; 1987). Esse aumento de sensibilidade do ensaio foi atribuído ao fato da fita dupla de DNA, uma vez exposta a pH extremamente alcalino (pH > 12), sofrer desnaturação, isto é, separar-se em fitas simples de DNA (RYDBERG, 1980).

1.4.2 Avaliação da mutagenicidade através do Ensaio com *Salmonella typhimurium*

O ensaio de mutação reversa empregando *Salmonella typhimurium*, também conhecido como Teste de Ames, é capaz de detectar mutações gênicas causadas, por exemplo, por substituições, adições ou deleções de bases nitrogenadas. Esse ensaio é mundialmente utilizado para determinar o potencial mutagênico de substâncias químicas e misturas devido à sua rápida resposta. Outra vantagem é o alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (61 % de acordo com o estudo realizado pelo *National Toxicology Program* para 446 compostos) (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Outra aplicação deste teste inclui a análise de amostras ambientais, como ar, água, resíduos, solos e sedimentos (JARVIS et al., 1996).

As linhagens de *Salmonella* utilizadas no Teste de Ames são capazes de produzir azorredutases e nitrorredutases (PRIVAL; MITCHELL, 1982), além de apresentarem mutações nos genes responsáveis pela biossíntese de histidina e, conseqüentemente, não conseguem sintetizar esse aminoácido. Assim, uma nova mutação é necessária para que consigam crescer na ausência de histidina, o que caracteriza a exposição da bactéria a agentes mutagênicos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Cada linhagem utilizada apresenta uma sensibilidade específica para diferentes classes de mutágenos. Desse modo, a combinação delas permite identificar diversos agentes que podem interferir com o DNA (BENIGNI; BOSSA, 2011). As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para a triagem de amostras, sendo capazes de detectar compostos que causam o deslocamento do quadro de leitura e a substituição de pares de bases, respectivamente (MARON; AMES, 1983).

Alguns compostos precisam ser metabolizados para apresentarem atividade mutagênica. Em muitos seres vivos, incluindo o ser humano, o sistema metabólico de oxidação Citocromo P450 (CYP) realiza o processo de biotransformação de uma ampla gama de substâncias, gerando outras que, por sua vez, podem reagir com o DNA. Logo, também é importante mimetizar esse sistema nos ensaios de mutagenicidade através da adição de um sistema de metabolização exógena (mistura S9). Essa solução é constituída por um homogenato de células de fígado de rato pré tratado com mistura de bifenilas policlorinadas (Aroclor 1254), que induz o aumento da expressão de enzimas relacionadas ao CYP e seus cofatores (MARON; AMES, 1983).

1.4.3 Avaliação do potencial embrio-tóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

O *zebrafish*/paulistinha (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce que atingem no máximo 5 centímetros de tamanho, sendo nativo de rios do sul da Ásia, pertencente à família dos Cyprinidae e à ordem dos Cypriniformes. Sua característica mais marcante é o padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo (Figura 2). É uma espécie que possui nadadeiras anal e caudal e, em geral, os machos são mais delgados e escuros do que as fêmeas (LAWRENCE, 2007; SPENCE et al., 2008).

Dentre as características que facilitam seu cultivo em laboratórios de pesquisa e permitem a realização de estudos (eco)toxicológicos estão: tamanho pequeno, facilidade de manutenção, produção de grande número de embriões com desenvolvimento externo ao útero da fêmea, transparência dos ovos e larvas (possibilitando acompanhar seu desenvolvimento e observar a presença de má-formações em tempo real), curto ciclo de reprodução e alcance da maturidade sexual após poucos meses do nascimento dos embriões, além da caracterização completa de seus genoma e alta similaridade genética aos humanos (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ et al., 2008).

Quando os genes do *zebrafish* são comparados e relacionados aos dos humanos, observa-se que 71,4 % dos genes humanos possuem pelo menos um ortólogo pisco, e de maneira recíproca, 69 % dos genes do *zebrafish* possuem pelo menos um ortólogo humano. Ainda, existem casos onde não há um gene ortólogo clássico entre estas espécies, porém ambos possuem proteínas codificadas para o exercício de funções similares através de sequências genômicas diferentes, como ocorre com a oncostatina-M e a interleucina-6 (HOWE et al., 2013).

Figura 2 – Morfologia externa do *zebrafish*, ressaltando seu padrão típico de listras pretas e brancas ao longo do corpo.



Fonte: <http://oregonstate.edu/terra/wp-content/uploads/2013/07/Zebrafish1-small.jpg>

Os testes de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio* surgiram da necessidade de desenvolver experimentos alternativos aos testes com peixes adultos após as discussões éticas que envolvem a experimentação animal e o sofrimento e a dor causados a estes quando utilizados para fins científicos (NAGEL, 2002). A diretiva internacional 86-609-CEE (UNIÃO EUROPEIA, 1986) já previa a necessidade de implantação de métodos alternativos de experimentação animal, seguindo o conceito da “política dos 3 Rs” (da inicial em inglês para Redução [*Reduction*] do número de animais, Refinamento [*Refinement*] dos ensaios, e Substituição [*Replacement*] dos testes com animais por modelos alternativos), descrita por Russell e Burch (1959). Esta foi consolidada com a diretiva 2010/63/EU, após ser discutida por Balls e Straughan (1996), considerando que os estágios iniciais do desenvolvimento do *zebrafish* não precisam de regulamentação especial uma vez que embriões e larvas que não alcançaram a alimentação exógena não são considerados animais (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

Para uma maior compreensão do alcance e da validade dos testes com embriões de *zebrafish* recomendo a leitura criteriosa e na íntegra dos artigos “DarT: The embryo test with zebrafish *Danio rerio* – A general in ecotoxicology and toxicology” (NAGEL, 2002) e “OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing” (BUSQUET et al., 2014).

1.5 Avaliação da permeabilidade através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

O Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) é simples e rápido quando o objetivo é mensurar a permeabilidade passiva de um composto na ausência de sistemas de efluxo, e se tornou uma importante ferramenta para a predição da permeabilidade *in vivo* de compostos para a avaliação de seus mecanismos de transporte (CHEN et al., 2008).

Inicialmente formulado por Kansy, Senner e Gubernator (1998), este ensaio consistia de uma membrana artificial preparada pela impregnação de filtros porosos com uma solução de lipídeos e outros constituintes das membranas biológicas. No método original a solução lipídica consistia de 1-20 % de lecitina em solução orgânica (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998). Posteriormente, foram desenvolvidos os métodos biomimético, de mergulho duplo, e baseado em solução lipídica, formando membranas artificiais através da utilização de soluções lipídicas (CHEN et al., 2008).

O desenvolvimento de uma membrana artificial estável pré-revestida e com possibilidade de armazenamento pela empresa Corning permitiu uma simulação de permeabilidade passiva próxima à de membranas biológicas e com alto valor preditivo para absorção oral humana (SHANLER et al., 2013).

1.6 Avaliação do risco

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), a avaliação ecológica do risco é o processo de avaliar como o meio ambiente pode ser impactado pela exposição de um ou mais “estressores”, sejam eles substâncias químicas, mudanças climáticas, doenças ou espécies invasivas (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2016). A avaliação do risco envolve, basicamente, os processos de planejamento e definição dos objetivos, em conjunto com a pesquisa dos materiais disponíveis na literatura, a formulação do problema (fase 1), onde as informações disponíveis irão determinar quais são os riscos e o que precisa ser protegido no meio ambiente, a análise das informações disponíveis (fase 2), onde são determinadas que plantas ou animais podem ser expostos, em qual grau ocorre essa exposição, e se há a possibilidade de ocorrer efeitos ecológicos prejudiciais, e por fim a caracterização do risco (fase 3), incluindo a estimativa e a descrição do risco (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2016).

A avaliação do risco pode ser realizada através de uma infinidade de métodos e modelos, que podem ser classificados entre “padrões” e “não-padronizados”. Os primeiros estão relacionados aos métodos descritos por organizações internacionais oficiais ou por agências de harmonização/padronização nacionais, como a OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), US EPA (*United States Environmental Protection Agency*), ASTM (*American Society for Testing and Materials*), AFNOR (*Association Française de Normalisation*) e ISO (*International Organization for Standardization*) (ÅGERSTRAND; BREITHOLTZ; RUDÉN, 2011).

Os estudos de ecotoxicologia publicados na literatura científica contribuem para que avaliadores do risco tenham os conhecimentos necessários para uma adequada condução de seus trabalhos. Porém, a avaliação da confiabilidade e da relevância dos dados está sujeita à análise de cada avaliador. Um dos métodos mais recomendados (e o método de escolha de muitas agências europeias) é o descrito por Klimisch, Andreae e Tillmann (1997) (MOERMOND et al., 2016), ainda que seja um método inespecífico, não contenha alguns critérios essenciais para uma avaliação completa, e nem indique precisamente em quais trabalhos científicos há confiabilidade e relevância, resultando na livre interpretação de cada avaliador. Já a EPA desenvolveu

recentemente o seu próprio guia para a realização de avaliações do risco (MOERMOND et al., 2016).

Em algumas áreas da Ciência já existem recomendações sistemáticas bem descritas, como o *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) para a Epidemiologia, o *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) para os estudos de toxicidade *in vivo*, e o *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME) para os estudos envolvendo análises por *microarray* (MOERMOND et al., 2016).

Para os estudos de ecotoxicidade foi reportado recentemente o Projeto CRED (*Criteria for Reporting and Evaluating Ecotoxicity Data*), com o objetivo de aumentar a reprodutibilidade, a consistência e a transparência dos estudos de ecotoxicidade quanto às suas confiabilidades e relevâncias (MOERMOND et al., 2016). O Projeto CRED foi direcionado inicialmente aos estudos de ecotoxicidade aquática, porém pode ser adaptado para as demais áreas da Ciência quando necessário. As peculiaridades do método estão descritas na sequência desta Tese, na seção Material e Métodos (item 3.6), já que foi o método de escolha para a avaliação do risco ecogenotóxicológico do corante *Acid Black 210* realizada no presente estudo.

Ainda, os autores trazem 50 diferentes critérios de recomendação divididos em 6 categorias (informações gerais, desenho do estudo, substância testada, organismo testado, condições de exposição, e desenho estatístico/resposta biológica) para servir de guia aos pesquisadores que pretendem contribuir com dados experimentais de ecotoxicologia aquática (MOERMOND et al., 2016).

Conheço muitos adultos que ficam desconcertados quando as crianças pequenas fazem perguntas científicas. Por que a Lua é redonda? (...) "Como é que você queria que a Lua fosse, quadrada?" As crianças logo reconhecem que esse tipo de pergunta incomoda os adultos. Novas experiências semelhantes, e mais uma criança perde o interesse pela ciência. Porque os adultos têm de fingir onisciência diante de crianças de seis anos é algo que nunca vou compreender. O que há de errado em admitir que não sabemos alguma coisa? A nossa auto-estima é assim tão frágil?

Carl Sagan

Objetivos

- II -

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal a avaliação do risco ecogenotoxicológico dos corantes *Acid Black 210* e *Disperse Violet 93*, utilizados pelas indústrias têxteis e coureiras nacionais e internacionais. Para atingir estes objetivos, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

- Avaliação da permeabilidade do corante *Acid Black 210* através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA);
- Avaliação do potencial genotóxico do corante *Acid Black 210* através do Ensaio do Cometa com células HepG2;
- Avaliação do potencial mutagênico do corante *Acid Black 210* através do Teste de Ames com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100;
- Avaliação do potencial embrio-tóxico do corante *Acid Black 210* através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*);
- Avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização do corante têxtil *Acid Black 210*.

- Avaliação do potencial genotóxico do corante *Disperse Violet 93* através do Ensaio do Cometa com células HaCaT;
- Avaliação do potencial embrio-tóxico do corante *Disperse Violet 93* através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

- Avaliação do potencial embrio-tóxico de efluente de curtume pré-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish*
- Avaliação do potencial embrio-tóxico de efluente de curtume pós-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish*

“Achar-se situada à margem do mundo não é posição favorável para quem quer recriá-lo.”

Simone de Beauvoir

Material e Métodos

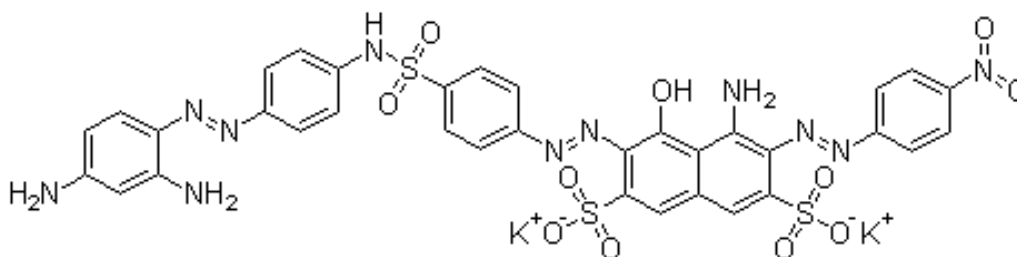
- III -

MATERIAL E MÉTODOS**3.1 Amostras em estudo**

O corante *Acid Black 210* (Figura 3) foi gentilmente cedido pela “Ecovita Indústrias Químicas Ltda.”, produzido originalmente pela “Chemische Fabriek Triade B.V.” com 50-80 % de pureza de acordo com o laudo fornecido pelo produtor. Algumas características físico-químicas deste corante encontradas na literatura científica são apresentadas a seguir:

- Número CAS: 99576-15-5
- Índice de números de constituição de cor: C.I. 300285
- Registro EPA: *2,7-naphthalenedisulfonic acid, 4-amino-6-[[[4-[[[4-(2,4-diaminophenyl) azo] phenyl] amino] sulfonyl] phenyl] azo]-5-hydroxy-3-[(4-nitrophenyl) azo]-, dipotassium salt*
- Fórmula molecular: $C_{34}H_{25}K_2N_{11}O_{11}S_3$
- Peso molecular: 938,02 g / mol
- LogP: 12,64
- Área de superfície polar: 403,98 Å²
- Solubilidade em água: > 100 g / L (25 °C)
- Densidade: 600-800 Kg / m³
- Aparência: sólido preto (pó) inodoro
- Nome comercial: *Triacolor Black TNL-A Concentrado*

Figura 3 – Estrutura química do corante *Acid Black 210*.

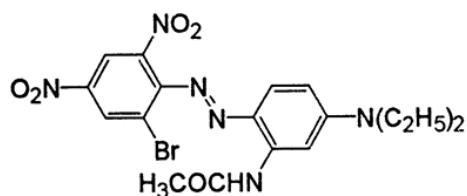


Fonte: <http://images-a.chemnet.com/suppliers/chembase/cas/cas99576-15-5.gif>

O corante *Disperse Violet 93* (Figura 4) foi purificado de acordo com a metodologia descrita por Vacchi et al. (2013) e gentilmente cedido pela Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (UNICAMP). Algumas características físico-químicas deste corante encontradas na literatura científica são apresentadas a seguir:

- Número CAS: 52697-38-8
- Registro EPA: *acetamine, N-[2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl) azo]-5-(diethylamino)phenyl]-*
- Fórmula molecular: $C_{18}H_{19}BrN_6O_5$
- Peso molecular: 479,28 g / mol
- Densidade: 1.550 Kg / m³

Figura 4 – Estrutura química do corante *Disperse Violet 93*.



Fonte: http://www.worlddyevariety.com/wp-content/uploads/2012/03/Disperse_Violet_93.gif

Amostras de efluente industrial bruto e tratado foram coletadas em abril de 2015 na entrada e na saída do sistema de tratamento de um curtume localizado na microrregião de Franca-SP e mesorregião de Ribeirão Preto-SP através da parceria com a equipe da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB – Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto), de acordo com as normas 1060-B e 9060 dos métodos padronizados para a avaliação de águas e efluentes da Associação Americana de Saúde Pública (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012).

Os efluentes foram analisados quanto a seus pHs, e temperaturas do ar e da água no momento da coleta, além dos ensaios de demanda biológica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012). Para o efluente tratado também foi realizada a análise de sólidos sedimentáveis, óleos, graxas e sulfetos (APHA, 2012), cádmio, chumbo, cobre, ferro, níquel e zinco (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1994)

3.2 Ensaio do Cometa

O Ensaio do Cometa foi realizado com base na metodologia de Östling e Johanson (1984), de acordo com as modificações propostas por Singh et al. (1988), e seguindo o protocolo estabelecido por Tice et al. (2000) com algumas adaptações.

Células HepG2 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (n° HB8065) e mantidas em meio de cultivo DMEM (Sigma, EUA) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) e antibióticos (100 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina) em atmosfera contendo 5 % de CO₂ e 96 % de umidade a 37 °C. Alíquotas da cultura celular foram congeladas com solução de sulfóxido de dimetilo e soro bovino fetal (10 % DMSO e 90 % SBF) e mantidas em nitrogênio líquido. Células HaCaT foram obtidas do *Institut de Biologie et Chimie des Protéines* (França) através do Banco de Células do Rio de Janeiro (n° 0341), sendo mantidas nas mesmas condições descritas.

Para a manutenção da cultura celular durante os ensaios, após as células atingirem 80 % de confluência, o meio de cultivo da garrafa de cultura foi descartado e as células aderidas lavadas com tampão fosfato salino (PBS), seguido da adição de 1 mL de tripsina 0,05 % por 3-5 minutos a 37 °C. O procedimento seguiu com a adição de 1 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SBF, transferência do conteúdo para um tubo falcon de 15 mL e centrifugação a 1.500 rpm (212 g) por 5 minutos em centrífuga clínica Centribio 80-2B (BioVera, Brasil).

O *pellet* obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio DMEM seguido de contagem em câmara de Neubauer para a obtenção da quantidade necessária para o plaqueamento, com aproximadamente 0,5 mL colocado em novo frasco de cultura celular de 75 cm² contendo 14,5 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SBF e antibióticos (100 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina), mantido em atmosfera contendo 5 % de CO₂ a 37 °C, caracterizando uma nova “passagem” das células. Os experimentos foram realizados com células entre a 3ª e a 6ª passagens.

Em uma placa de cultura de células de 24 poços foram colocados o volume de suspensão celular referente a 2 x 10⁵ células HepG2 ou HaCaT em meio DMEM suplementado com 10 % de SBF q.s.p. 2 mL. As placas, assim preparadas, foram mantidas em atmosfera contendo 5 % de CO₂ a 37 °C por 24 horas.

Após esse período foi realizado o tratamento das culturas celulares com o controle negativo e soluções do corante *Acid Black* 210 preparadas em meio DMEM nas concentrações de 0,5, 5, 50, 500 e 5.000 µg / mL por 4 horas. Como controle positivo foi utilizado metil metano sulfonato (MMS) 15 µM (Sigma-Aldrich, EUA) por 3 horas. As placas foram mantidas em atmosfera contendo 5 % de CO₂ a 37 °C. Para o

corante *Disperse Violet* 93 houve o preparo das soluções nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 600 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em meio DMEM seguindo as demais condições descritas para o corante AB210. Para a escolha das concentrações máximas testadas cabe ressaltar que de acordo com Tice et al. (2000) (apud GONTIJO; TICE, 2003), deve-se testar múltiplas doses da substância teste até o nível máximo de citotoxicidade, que é de 70 % para o Ensaio do Cometa. Caso a concentração máxima não seja conhecida, esta não deve ultrapassar 5.000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. No caso do corante *Disperse Violet* 93 foi observado que doses acima de 600 $\mu\text{g} / \text{mL}$ sofriam precipitação de partículas, inviabilizando o estudo de concentrações acima desse valor (dados não mostrados).

Ao final do tratamento as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o sobrenadante descartado. As suspensões celulares foram divididas em duas alíquotas. A primeira (20 μL) foi utilizada para o teste de viabilidade celular, e a segunda (30 μL) foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % (140 μL), transferindo-se duas alíquotas desta mistura (65 μL) sobre lâminas previamente revestidas com agarose 1,5 %. As lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas em geladeira a 4 °C por 15 minutos. Após este período as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise por 22 horas a 4 °C.

Decorrido o tempo da lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de vidro contendo solução de eletroforese por 20 minutos para permitir a desnaturação do DNA. Em seguida, as lâminas foram submetidas a um campo elétrico de intensidade 0,78 V / cm (25 V e 300 mA) por 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização por 15 minutos. Depois de secarem à temperatura ambiente (25 °C), as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas até o momento da análise.

No momento da leitura, as lâminas foram coradas com o agente intercalante brometo de etídio 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Foram analisadas 100 imagens de nucleoides para cada amostra, distribuídas igualmente nas duas lâminas, com o auxílio do microscópio de fluorescência Eclipse E-200 (Nikon, Japão) utilizando filtro de excitação de 510-550 nm e filtro de barreira de 570 nm, com aumento original de 40x.

Os cometas foram avaliados por meio do *software* de análise de imagem *CometAssay IV*, versão 4.3 (Perceptive Instruments Ltda.), sendo analisados os parâmetros “intensidade da cauda” (*tail intensity*), referente à porcentagem de DNA na cauda, e “momento da cauda” (*tail moment*), que considera tanto a migração do material genético quanto a quantidade desse material na cauda através do equivalente ao torque da cauda, representando de forma numérica a relação entre a distância da posição central da cabeça e a distância da cauda (representada pelo seu centro de gravidade) (HELLMAN; VAGHEF; BOSTRÖM, 1995).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$) com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5* (MOTULSKY, 2007).

3.2.1 Teste de viabilidade celular

Uma alíquota da suspensão celular (20 μ L) foi utilizada para a avaliação da viabilidade empregando o método de exclusão pelo corante azul de tripano (Sigma-Aldrich, EUA), garantindo o uso de células viáveis no ensaio (TICE et al., 2000), tendo como fundamento a incorporação do corante pelas células inviáveis quando estas não apresentam membrana celular íntegra, tornando-se azuladas mediante observação em microscópio.

Para isso, a suspensão celular foi homogeneizada com 20 μ L de azul de tripano 40 % diluído em PBS (1:0,4 p / V), sendo que uma fração foi utilizada para preencher a câmara de Neubauer. Foram avaliadas 100 células para cada amostra e a porcentagem de células viáveis (incolores) foi determinada.

Cabe ressaltar que esta técnica permite a detecção de células inviáveis que possuem danos em sua membrana celular, porém não detecta células inviáveis que podem progredir para a morte celular por outros motivos (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

3.2.2 Soluções utilizadas

- Meio de cultivo celular

O meio de cultivo DMEM (Sigma, EUA) foi suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) e antibióticos (100 U / mL de penicilina e 100 μ g / mL de estreptomicina).

- Tampão fosfato salino (PBS)

Em balão volumétrico foram dissolvidos 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio anidro (KH_2PO_4), 8 g de cloreto de sódio (NaCl) e 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4) em água deionizada q.s.p. 1 L. Após a completa solubilização dos reagentes, o pH foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, e a solução foi autoclavada por 20 min a 121 °C.

- Tripsina 0,05 %

A tripsina é uma enzima proteolítica utilizada para o desprendimento das células dos frascos de cultura através da degradação da matriz glicoproteica extracelular. Seu preparado foi realizado na proporção de 1:9 em PBS estéril através da (Sigma-Aldrich).

- Agarose 1,5 % (preparação das lâminas)

As lâminas utilizadas nos experimentos foram preparadas através do mergulho em solução de agarose 1,5 % a 60 °C. Para o preparo desta solução, 3,3 g de agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, EUA) foram dissolvidos em solução de PBS:H₂O (1:10) q.s.p. 150 mL através do aquecimento em forno microondas até a completa solubilização.

- Agarose L.M.P. 0,5 % (agarose baixo ponto de fusão)

Esta solução de agarose foi estabilizada em banho-maria a 37 °C para utilização, e seu preparo se deu através da dissolução de 250 mg de agarose baixo ponto de fusão (UltraPure™ Low Melting Point Agarose, Invitrogen) em solução de PBS:H₂O (1:10) q.s.p. 50 mL através do aquecimento em forno microondas até a completa solubilização.

- Solução de lise (estoque)

Foram dissolvidos 233,7 g de NaCl, 59,52 g de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 1,92 g de Trizma® base (Sigma, EUA) em água deionizada q.s.p. 1,6 L. O pH da solução foi ajustado para 10 com hidróxido de sódio. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz direta.

- Solução de lise (uso)

Foram solubilizados 4 mL de Triton® X-100 (Merck, Alemanha) e 40 mL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) em solução de lise (estoque) q.s.p. 400 mL. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz direta. Após o preparo, a solução foi transferida para um *coppling* e armazenada em geladeira a 4 °C por 2 horas.

- Solução de EDTA 200 mM (solução A)

Foram dissolvidos 3,72 g de EDTA em água deionizada q.s.p. 50 mL. O pH da solução foi ajustado para 10 com hidróxido de sódio. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz direta.

- Solução de NaOH 10 N (solução B)
Foram dissolvidos 100 g de NaOH em água deionizada q.s.p. 250 mL.
- Solução de eletroforese (EDTA 1 mM, NaOH 300 nM)
Foram diluídos 10 mL da solução A e 60 mL da solução B em água deionizada q.s.p. 2 L a 4 °C, com posterior verificação do pH (pH > 13).
- Solução de neutralização
Foram dissolvidos 77,6 g de Trizma[®] base (Sigma, EUA) em água deionizada q.s.p. 1,6 L. O pH da solução foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz direta.
- Solução de coloração (brometo de etídio 20 µg / mL)
Foram diluídos 10 µL de solução de brometo de etídio 10 mg / mL (Invitrogen, EUA) em água deionizada q.s.p. 5 mL. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz direta.

3.3 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O ensaio de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) foi realizado com base no protocolo de incubação desenvolvido por Maron e Ames (1983), com as adaptações descritas por Mortelmans e Zeiger (2000).

Foram utilizadas as linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100 obtidas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB – São Paulo) e mantidas em freezer a -70 °C em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 % como agente crioprotetor. As características genéticas de ambas as linhagens estão descritas na Tabela 1. Para que os resultados dos ensaios sejam confiáveis é necessário verificar as características genéticas relacionadas à cada linhagem. Para isso, foram realizados os ensaios descritos por Umbuzeiro e Vargas (2003).

O primeiro ensaio consiste em avaliar a dependência de histidina para o crescimento das bactérias, que deve ocorrer em placas contendo biotina e histidina em excesso, porém não em placas contendo somente biotina. O segundo ensaio consiste em avaliar a mutação *rfa*, onde as bactérias são colocadas em contato com solução de cristal violeta a 1 %, formando um halo de inibição ao redor da solução. O terceiro ensaio consiste em avaliar a resistência ao antibiótico ampicilina (plasmídeo pKM101). As bactérias são expostas ao antibiótico, devendo crescer normalmente na sua presença. O quarto ensaio consiste na avaliação da exposição das bactérias à luz

ultravioleta, com o crescimento inibido após 15 segundos de exposição. O quinto ensaio consiste na avaliação da taxa de reversão espontânea de cada linhagem (Tabela 1) (VARGAS; UMBUZEIRO, 2003; ZANONI, 2004).

Tabela 1 – Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100.

Linhagem	Mutação <i>his</i> ¹	Tipo da mutação	Taxa de reversão espontânea	LPS ²	Reparo	Mutação para biotina	Plasmídeo
TA98	<i>hisD3052</i>	Deslocamento do quadro de leitura	25-75	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	<i>bio</i> ⁻	pKM101 (Ap ^r)
TA100	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de bases	75-225	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	<i>bio</i> ⁻	pKM101 (Ap ^r)

¹Mutação responsável pela síntese da histidina

²Permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

Δ *uvrB* = deleção do gene *uvrB*; Ap^r = ampicilina resistente

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas (TA98 e TA100) foram mantidas em freezer a -70 °C, sendo descongeladas no dia do ensaio, inoculadas em meio caldo nutriente, e mantidas *overnight* a 37 °C sob agitação de 160 rpm em incubadora de bancada CT-712 (CienTec, Brasil).

Uma alíquota de 100 µL da cultura bacteriana foi diluída em 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (para o ensaio na ausência de ativação metabólica) ou mistura S9 (para o ensaio na presença de ativação metabólica), e 100 µL de solução do corante *Acid Black* 210 em água deionizada, em tubo de vidro, seguida de incubação a 37 °C por 30 minutos. As concentrações finais do corante AB210 variaram entre 0,5 e 5.000 µg / placa. Ao final desta etapa, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície em cada tubo, e o conteúdo vertido em placas de vidro contendo ágar mínimo solidificado. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 66 horas.

Como controle negativo foram utilizadas 5 placas contendo 100 µL de água deionizada nas condições testadas, e como controle positivo foram utilizadas 2 placas contendo 10 µL de óxido de 4-nitroquinolina 0,05 µg / µL (para o ensaio na ausência de ativação metabólica) ou 10 µL de 2-aminoantraceno 0,25 µg / µL (para o ensaio na presença de ativação metabólica). Ao final do ensaio o número de colônias em cada placa foi contabilizado.

Os resultados foram expressos em média do número de revertentes \pm desvio padrão. A potência mutagênica foi obtida através da inclinação da reta no gráfico empregando o *software* Salanal (*Salmonella Assay Analysis*), através do modelo Bernstein, que utiliza ANOVA e regressão linear para a realização da análise dos dados (BERNSTEIN et al., 1982; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

3.3.1 Teste de viabilidade celular

Em paralelo foi realizada a avaliação da viabilidade através de uma alíquota de 100 µL de cultura bacteriana em frascos contendo água de diluição. Essa solução foi homogeneizada vigorosamente e 100 µL foram transferidos para outro frasco contendo água de diluição. Após homogeneização, 100 µL foram transferidos para placas de vidro contendo ágar nutriente solidificado, e a solução foi espalhada com o auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 horas e as colônias foram contadas após esse período. De acordo com os padrões aceitos internacionalmente, a densidade da cultura deveria estar contida entre 1 e 2 x 10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC) / mL (contagem de colônias por placa: entre 100 e 200) (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

3.3.2 Soluções utilizadas

- Meio de cultivo “caldo nutriente”

Foram solubilizados 2,5 g de nutriente Broth nº 2 (Oxoid) água deionizada q.s.p. 100 mL, com posterior distribuição de 20 mL em frascos tipo Schott e esterilização em autoclave.

- Tampão fosfato de sódio 0,2 M

Em balão volumétrico foram dissolvidos 28,4 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) em água deionizada q.s.p. 1 L (Solução A). Em balão volumétrico foram dissolvidos 27,6 g de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄.H₂O) em água deionizada q.s.p. 1 L (Solução B). O tampão fosfato de sódio 0,2 M foi constituído por 880 mL da Solução A e 120 mL da Solução B. O pH foi ajustado para 7,4, com posterior esterilização da solução em autoclave.

- NADP 0,1 M

Foram dissolvidos 0,7654 g de NADP (β nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) em água deionizada q.s.p. 10 mL, com posterior filtração em membrana de 0,22 µM.

- Glicose-6-fosfato 1 M

Foram dissolvidos 2,821 g de glicose-6-fosfato em água deionizada q.s.p. 10 mL, com posterior filtração em membrana de 0,22 µM.

- Solução de sais

Foram dissolvidos 8,13 g de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e 12,30 g de cloreto de potássio (KCl) em água deionizada q.sp. 100 mL, com posterior esterilização em autoclave.

- Fração S9

Este reagente é adquirido liofilizado e congelado (Molecular Toxicology, EUA). No momento do uso o mesmo é ressuspendido em 2,1 mL de água deionizada estéril.

- Mistura S9

Constituída por 39,5 mL de água deionizada estéril, 50 mL de tampão fosfato 0,2 M, 4 mL de NADP 0,1 M, 0,5 mL de glicose-6-fosfato 1 M, 2 mL de solução de sais e 4 mL de fração S9, preparada em ambiente asséptico.

- Ágar de superfície

Foram dissolvidos 3 g de bacto ágar (BD, EUA) e 2,5 g de cloreto de sódio (NaCl) em água deionizada q.s.p. 500 mL, com posterior esterilização em autoclave.

- Solução de ágar

Foram dissolvidos 15 g de bacto ágar (BD, EUA) em 780 mL de água deionizada, com posterior esterilização em autoclave e estabilização em banho-maria a 55 °C.

- Solução de glicose

Foram dissolvidos 20 g de glicose em água deionizada q.s.p. 200 mL, com posterior esterilização em autoclave e estabilização em banho-maria a 55 °C.

- Solução de Vogel-Bonner

Foram dissolvidos 10 g de sulfato de magnésio pentahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 91,43 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), 500 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 175 g de fosfato de sódio e amônio tetra hidratado ($NaNH_4PO_4 \cdot 4H_2O$) em água deionizada q.s.p. 1 L, com posterior esterilização em autoclave e estabilização em banho-maria a 55 °C.

- Solução de biotidina

Foram dissolvidos 0,0122 g de D-biotina e 0,0078 g de L-histidina em água deionizada q.s.p. 100 mL, com posterior esterilização em autoclave e estabilização em banho-maria a 55 °C.

- Ágar mínimo

Constituído por 780 mL de solução de ágar, 200 mL de solução de glicose, 20 mL de solução de Vogel-Bonner e 12 mL de solução de biotidina. Foram distribuídos 20 mL desse meio em cada placa de Petri estéril utilizada no ensaio.

- Água de diluição

Em balão volumétrico foram dissolvidos 34 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em água deionizada q.s.p. 1 L (Solução C). Em balão volumétrico foram dissolvidos 81,1 g de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em água deionizada q.s.p. 1 L (Solução D). A água de diluição foi constituída por 1,25 mL de Solução C e 5 mL de Solução D em água deionizada q.s.p. 1 L. Foram distribuídos 90 mL dessa solução em frascos de vidro, com posterior esterilização em autoclave.

- Ágar nutriente

Foram dissolvidos 25 g de Nutriente Broth nº 2 (Oxoid, Reino Unido) e 15 g de bacto ágar (BD, EUA) em água deionizada q.s.p. 1 L, com posterior esterilização em autoclave e estabilização em banho-maria a 55 °C. Foram distribuídos 20 mL desse meio em cada placa de Petri estéril utilizada no ensaio.

3.4 Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Os peixes adultos machos e fêmeas do *zebrafish* foram adquiridos inicialmente da Psicultura São Matheus (São Carlos, SP) e mantidos em aquário a 26 ± 1 °C em ciclo claro:escuro de 14:10 horas e alimentados com ração comercial no equipamento ZebTech (Tecniplast, EUA) (Figura 5). Este equipamento possui um sistema de manutenção da temperatura, correção do pH (7,0 a 7,5) regulado pela adição automática de solução de bicarbonato de sódio, e correção da condutividade (450 μS) regulada pela adição automática de solução de sal marinho. Para a aquisição dos ovos, a primeira etapa é a transferência separada de peixes machos e fêmeas na proporção de 3:1 para os compartimentos disponíveis em um sistema próprio de reprodução assistida (iSpawn) (Tecniplast, EUA) (Figura 5).

Os peixes foram mantidos nestes compartimentos *overnight* e o acasalamento é iniciado logo após a iluminação do aquário (ciclo claro:escuro) da manhã seguinte. Após 1 (uma) hora da desova os ovos são coletados e transferidos para uma placa Petri, lavados e analisados por microscopia estereoscópica (SMZ-168) (Motic, Hong Kong) para separação dos ovos fertilizados. Os experimentos foram realizados com os ovos que alcançaram o estágio de 8 ou 16 células do período de clivagem (KIMMEL et al., 1995).

Figura 5 – Equipamento ZebTech instalado no Laboratório de Toxicologia Ambiental da FCFRP-USP para realização de ensaios de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio* (esquerda) e Sistema de Reprodução Assistida para a obtenção de embriões de *Danio rerio* (direita).



Fonte: Produção do próprio autor.

Os ovos de *Danio rerio* foram dispostos isoladamente em placas de 24 poços, com 2 mL de cada uma das concentrações testadas (n mínimo = 5) para cada corante (20 poços / concentração + 4 controles internos / placa). As avaliações morfofisiológicas foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos pela OECD nº 236 até a concentração máxima de corante de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Durante o período de 144 horas a cada 24 horas quatro indicadores de letalidade foram observados: coagulação dos ovos fertilizados, não formação de somitos, não desprendimento da cauda do embrião e ausência de batimentos cardíacos (OECD, 2013).

Também foram observados cinco *endpoints* de sub-letalidade: desenvolvimento do sistema ocular, movimentação espontânea, circulação sanguínea, desenvolvimento da pigmentação, e presença de edemas; e oito *endpoints* de teratogenicidade: má-formação da cabeça, dos otólitos, da cauda e do coração, escoliose, retardo no

crescimento, tamanho anormal da cauda e, ainda, má-formação da bexiga natatória (NAGEL, 2002).

Como controle negativo (Figura 6) foi utilizado água deionizada e como controle positivo 3,4-dicloroanilina 4 mg / L (Figura 7). As placas seguiram os procedimentos descritos para a manutenção dos peixes, que incluem o fotoperíodo de 14:10 horas entre claro:escuro e temperatura ambiente de 26 ± 1 °C.

Os ensaios foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto em 14/04/2016 sob o protocolo nº 16.1.157.60.8, de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/08, do Decreto nº 6.899/09 e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Anexo A).

Figura 6 – Embrião de *D. rerio* 24 horas pós-fertilização (controle negativo).

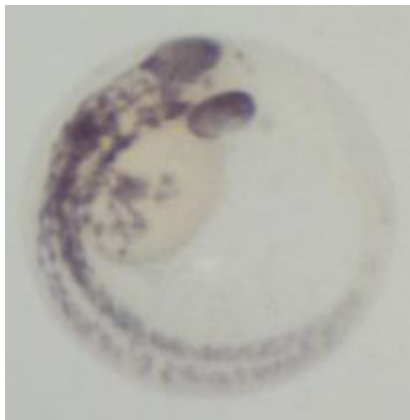
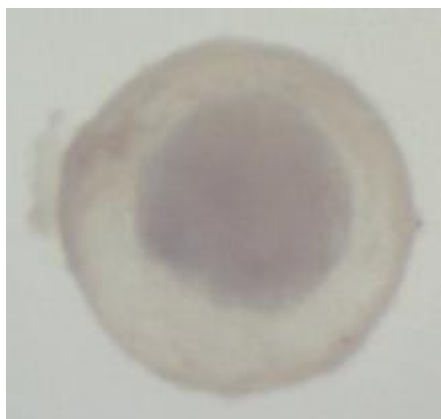


Figura 7 – Embrião de *D. rerio* 24 horas pós-fertilização em processo de coagulação (controle positivo 3,4-dicloroanilina 4 mg / L).



3.5 Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

O Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) foi realizado seguindo o protocolo descrito por Chen et al. (2008) com algumas adaptações. A placa de 96 poços *Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System* (Corning, USA) utilizada no ensaio foi mantida em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo descongelada no dia do ensaio e condicionada ao uso através da adição de tampão fosfato salino (PBS) por 30 minutos à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Uma alíquota de $250\text{ }\mu\text{L}$ de solução do corante *Acid Black 210* $60\text{ }\mu\text{g} / \text{mL}$ em PBS foi transferida para o compartimento doador, enquanto $250\text{ }\mu\text{L}$ de PBS foram adicionados ao compartimento receptor da placa. O conjunto doador-receptor em contato foi incubado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sem agitação por 5 horas. Após este período, o conjunto foi desacoplado e $100\text{ }\mu\text{L}$ da solução contida em cada compartimento foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O ensaio foi realizado em triplicata. A permeabilidade do corante foi calculada através da equação (1) (PETIT et al., 2016), onde V_D é o volume do compartimento doador ($0,2\text{ cm}^3$), A é a área da membrana ($0,3\text{ cm}^2$), τ_{SS} é o tempo para o soluto saturar a membrana e atingir o estado de equilíbrio (60 s), ϵ_a é a porosidade aparente do filtro (0,76), r_V é a razão do volume aquoso (1). R_M é a fração molar da amostra retida na membrana, calculada através da equação (2) (PETIT et al., 2016).

$$P_e = - \frac{2.303V_D}{A \cdot (t - \tau_{SS}) \cdot \epsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_V} \right) \cdot \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1 + r_V^{-1}}{1 - R_M} \right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right] \quad (1)$$

$$(1 - R_M) \cdot V_D C_{D(0)} = V_D C_{D(t)} + V_A C_{A(t)} \quad (2)$$

A análise por HPLC foi realizada em um cromatógrafo com bomba LC-10AT VP (Shimadzu, Japão) acoplado a um detector UV-Visível modelo SPD-10A VP, coluna LiChrospher® 100 RP-8 $5\text{ }\mu\text{m}$ e pré-coluna LiChroCART® 125-4 (Merck, Alemanha). A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água 80:20, com tempo de análise de 5 minutos, fluxo de $1.0\text{ mL} / \text{min}$ e $\lambda = 600\text{ nm}$ (ROCHA et al., 2016). Uma curva analítica foi construída entre $0,5$ e $100\text{ }\mu\text{g} / \text{mL}$ do corante *Acid Black 210* em PBS, com uma relação linear obtida através da equação $y = 3.091x + 2.490$, $R = 0,999$, $n = 8$.

A cafeína (Acros Organics, EUA) foi utilizada nas mesmas condições da substância-teste como controle para os experimentos realizados. Sua análise por HPLC foi realizada no mesmo cromatógrafo descrito anteriormente e em coluna LiChrospher® 100 RP-18 $5\text{ }\mu\text{m}$ (Merck, Alemanha) para $20\text{ }\mu\text{L}$ da solução contida em

cada compartimento da placa. A fase móvel utilizada foi acetronitrila:água 83:17, e $\lambda = 275$ nm (LOPES et al., 2007). Uma curva analítica foi construída entre 2 e 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em PBS, com uma relação linear obtida através da equação $y = 2.563x + 198,6$, $R = 0,999$, $n = 7$.

3.6 Avaliação do risco ecogenotóxicológico

O método de escolha para realizar a avaliação do risco ecogenotóxicológico no presente estudo foi o descrito por Moermond et al. (2016). O método de avaliação é denominado CRED (*Criteria for Reporting and Evaluating Ecotoxicity Data*), e está pautado em critérios relacionados à confiabilidade ($n = 20$) (Tabela 2) e à relevância ($n = 13$) (Tabela 3) dos estudos, recebendo uma dentre as seguintes classificações finais:

- R1/C1 – Confiável/Relevante sem restrições;
- R2/C2 – Confiável/Relevante com restrições;
- R3/C3 – Não confiável/relevante;
- R4/C4 – Não avaliado (quando não há dados experimentais suficientes para classificar cada estudo dentro das opções anteriores).

Cabe destacar que as classificações R3 e C3 estão relacionadas a estudos que possuem falhas graves quanto à confiabilidade dos dados apresentados e à relevância ao propósito estabelecido, respectivamente.

A avaliação do risco ecogenotóxicológico para o corante *Acid Black 210* foi realizada com base em todos os ensaios biológicos disponíveis na literatura científica de acordo com o Web of ScienceTM versão 5.22.3 até o final de junho de 2016, bem como os trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia Ambiental da FCFRP-USP coordenado pela Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira ($n = 3$). As informações foram organizadas e utilizadas para responder os critérios estabelecidos pelo método CRED (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Critérios de confiabilidade do método CRED (MOERMOND et al., 2016).

Número	Critério
<i>Informações Gerais:</i> Antes de avaliar o teste é importante conhecer as características físico-químicas do composto (buscas gerais / <i>handbook</i>). Qual é a solubilidade, log K_{OW} , ou pK_a ? A substância é volátil? Sofre processo de hidrólise, fotólise, etc.?	
<i>Desenho do estudo</i>	
1 ^a	O método utilizado é padronizado (ex.: OECD/ISO) ou modificado?
2 ^a	O ensaio foi realizado sob boas práticas de laboratório?
3	Se aplicável, os critérios de validade do ensaio foram observados (ex.: controle de sobrevivência, crescimento)?
4	Controles adequados foram utilizados (ex.: controles de solvente, negativo e positivo)?
<i>Substância testada</i>	
5	A substância foi identificada por nome ou número CAS? Os resultados estão relacionados a esta substância?
6	A pureza da substância está descrita? Ou, a origem da substância é confiável?
7	Se houver impurezas ou outros componentes de formulações: Estes exercem efeitos? A quantidade da substância na formulação é conhecida?
<i>Organismo testado</i>	
8	Os organismos estão bem descritos (ex.: nome científico, peso, comprimento, crescimento, idade/estágio de vida, cepa/clone, sexo quando apropriado)?
9	Os organismos provêm de uma fonte confiável e estão aclimatados às condições do ensaio? Eles nunca foram expostos previamente à substância testada ou a outros estressores ainda que de forma não intencional?
<i>Condições de Exposição</i>	
10	O sistema experimental é apropriado para a substância testada, considerando suas propriedades físico-químicas?
11	O sistema experimental é apropriado para o organismo testado (ex.: escolha do meio, alimentação, características da água utilizada, temperatura, ciclo claro:escuro, pH, oxigenação)? As condições de mantiveram estáveis?
12	As concentrações de exposição foram menores do que o limite de solubilidade em água (levando em consideração a utilização de solventes)? Se um solvente foi utilizado, ele apresentava concentrações e controles adequados?
13	O espaçamento correto entre as concentrações de exposição foram utilizados?
14	A duração da exposição foi definida?
15	As análises químicas foram adequadas para verificar a concentração da substância testada durante a duração do estudo?
16	Os organismos testados apresentaram biomassa compatível com o sistema testado dentro das faixas preconizadas apropriadas (ex.: 1 g / L)?
<i>Desenho estatístico / resposta biológica</i>	
17	O número de replicadas foi suficiente? O número de organismos por replicada foi suficiente em todos os controles e concentrações testadas?
18	O método estatístico utilizado foi apropriado?
19	Foi observada uma curva dose-resposta? A resposta foi estatisticamente significativa?
20	Há dados disponíveis e suficientes para checar os cálculos dos <i>endpoints</i> e critérios de validade do ensaio (se aplicável) (ex.: dados de controle, curvas concentração-resposta)?

^aEstes critérios apresentam menor importância para a avaliação da confiabilidade do estudo, porém são úteis para avaliações de apoio adicionais. CAS: Serviço de Resumos de Química; ISO: Organização Internacional para Padronização; K_{OW} : coeficiente de partição octanol-água; OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico; pK_a : constante de dissociação.

Tabela 3 – Critérios de relevância do método CRED (MOERMOND et al., 2016).

Número	Critério
<i>Informações Gerais:</i> Antes de avaliar o teste é importante indicar a necessidade de avaliação do estudo. A relevância do estudo poderá ser diferente de acordo com diferentes propósitos (ex.: critérios para a avaliação da qualidade ambiental, avaliação da persistência, bioacumulação e toxicidade, avaliação para autorização de <i>marketing</i>) dependendo dos motivos pelo qual foi solicitada.	
<i>Relevância Biológica</i>	
1	A espécie testada é relevante para o compartimento ambiental sob avaliação?
2	Os organismos testados são relevantes para a substância testada?
3	Os <i>endpoints</i> descritos são adequados para efeitos regulatórios?
4	Os <i>endpoints</i> descritos são adequados para investigar os efeitos ou modos de ação da substância testada?
5	O efeito observado é relevante a nível populacional?
6	A magnitude do efeito é estatisticamente significativa e biologicamente relevante para fins regulatórios (ex.: CE10, CE50)?
7	Foram estudados os estágios de vida adequados?
8	As condições experimentais são relevantes para a espécie testada?
9	A duração da exposição é relevante e apropriada para estudar a espécie e os <i>endpoints</i> ?
10	Se a recuperação for estudada, é relevante para a avaliação do estudo?
<i>Relevância de Exposição</i>	
11	No caso de formulações, outras misturas, sais, ou produtos de transformação, a substância testada é relevante e representativa do conjunto?
12	O cenário de exposição testado é relevante para a substância?
13	O cenário de exposição testado é relevante para a espécie?

CE10: Concentração efetiva 10 %; CE50: Concentração efetiva 50 %.

Já para o corante *Disperse Violet 93*, a avaliação preliminar do risco ecogenotóxicológico não utilizou os critérios descritos no CRED, pois não existem estudos descritos em todos os níveis tróficos que justifiquem a utilização de critérios de confiabilidade e relevância.

“A ausência da evidência não significa evidência da ausência.”

Carl Sagan

Resultados

– IV –

RESULTADOS**4.1 Avaliações toxicológicas do corante têxtil *Acid Black 210*****4.1.1 Avaliação do potencial genotóxico através do Ensaio do Cometa com células HepG2**

O potencial genotóxico do AB210 foi avaliado através do Ensaio do Cometa com células HepG2. De acordo com as recomendações propostas por Tice et al. (2000), é necessário verificar a viabilidade celular antes da realização do ensaio, com resultados preferencialmente não inferiores a 70 ou 80 %. No presente estudo a viabilidade celular para todas as amostras foi superior a 94 %, determinada através do método de exclusão pelo corante azul de tripano (TICE et al., 2000).

Por meio dos resultados obtidos pode-se notar que não houve diferença estatística significativa entre os valores de momento da cauda (*tail moment*) (Gráfico 1) ou intensidade da cauda (*tail intensity*) (Gráfico 2) quando o controle negativo é comparado às doses testadas, o que significa que este corante não induziu danos ao DNA das células HepG2 nas concentrações e condições utilizadas.

Gráfico 1 – Efeito do corante *Acid Black 210* sobre o DNA de células HepG2, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (*tail moment*). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. * $p < 0,05$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.

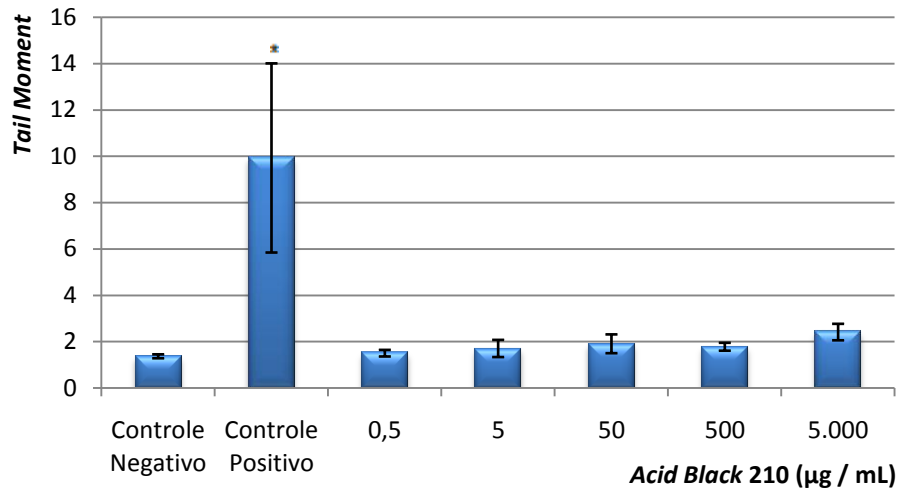
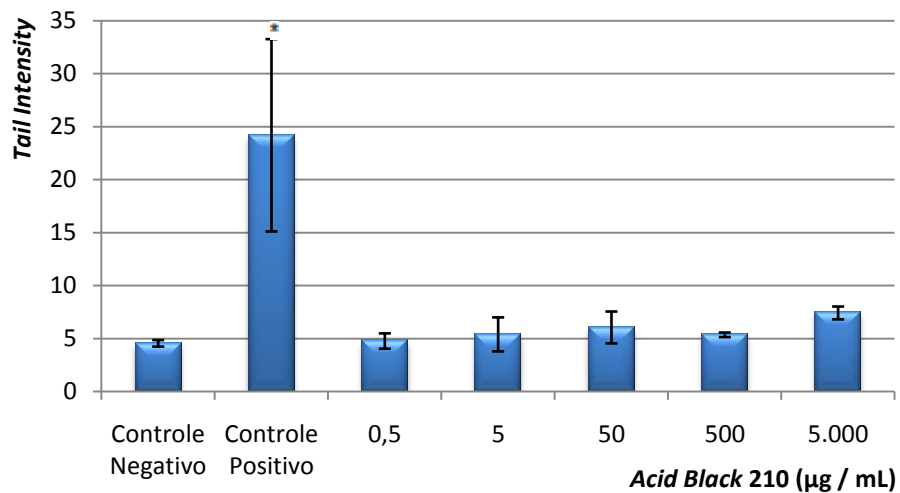


Gráfico 2 – Efeito do corante *Acid Black 210* sobre o DNA de células HepG2, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (*tail intensity*). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. * $p < 0,05$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.



4.1.2 Avaliação do potencial mutagênico através do Teste de Ames com a linhagem de *Salmonella typhimurium* TA98

O corante AB210 induziu mutagenicidade na linhagem de *S. typhimurium* TA98 com potência mutagênica de 0,017 e 0,124 revertentes / μg na ausência e presença de metabolização exógena (S9), respectivamente (Tabela 4). De acordo com a classificação do potencial mutagênico de Claxton et al. (1991) para esta linhagem, um composto químico se enquadra na categoria “extremamente baixo potencial mutagênico” quando o valor da potência mutagênica encontra-se entre 0,1 e 1 revertentes / μg . Logo, pode-se considerar que o AB210 praticamente não induz mutagenicidade na linhagem de *S. typhimurium* TA98 nas condições testadas. Cabe ressaltar que todos os ensaios foram acompanhados pelo teste de viabilidade, com valores dentro dos padrões aceitos internacionalmente: 1 a 2×10^9 UFC / mL (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Tabela 4 – Efeito do corante *Acid Black* 210 sobre a linhagem de *S. typhimurium* TA98 após 66 horas de exposição.

Concentração (μg / placa)	Média do número de revertentes / placa \pm desvio padrão	
	Ausência de S9	Presença de S9
Controle Negativo	37,00 \pm 4,64	32,20 \pm 3,11
Controle Positivo	540,50 \pm 19,09** ¹	2.564,00 \pm 356,38** ²
0,5	38,67 \pm 6,51	35,00 \pm 5,29
5	43,00 \pm 7,21	31,50 \pm 4,95
50	40,00 \pm 6,93	44,67 \pm 1,53**
500	55,00 \pm 8,72	94,33 \pm 11,06**
1.000	69,33 \pm 9,24*	---
2.000	62,50 \pm 0,71**	---
3.000	84,67 \pm 8,62**	---
4.000	132,67 \pm 10,02**	---
5.000	116,67 \pm 22,81**	263,33 \pm 22,37**
Potência mutagênica (rev / μg)	0,017	0,124

¹óxido de 4-nitroquinolina 0,05 μg / mL

²2-aminoantraceno 0,25 μg / mL

--- concentração não testada

*p < 0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo

**p < 0,01 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo

4.1.3 Avaliação do potencial mutagênico através do Teste de Ames com a linhagem de *Salmonella typhimurium* TA100

O corante AB210 não induziu mutagenicidade na linhagem de *S. typhimurium* TA100 tanto na ausência quanto na presença de metabolização exógena (S9) (Tabela 5) nas condições testadas. Cabe ressaltar que todos os ensaios foram acompanhados

pelo teste de viabilidade, com valores dentro dos padrões aceitos internacionalmente: 1 a 2×10^9 UFC / mL (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Tabela 5 – Efeito do corante *Acid Black 210* sobre a linhagem de *S. typhimurium* TA100 após 66 horas de exposição.

Concentração (μg / placa)	Média do número de revertentes / placa \pm desvio padrão	
	Ausência de S9	Presença de S9
Controle Negativo	223,60 \pm 14,67	189,60 \pm 19,18
Controle Positivo	2.522,00 \pm 381,84** ¹	3.488,00 \pm 565,69** ²
0,5	238,67 \pm 21,59	---
5	226,67 \pm 0,58	---
50	227,00 \pm 19,29	221,00 \pm 17,73
100	---	215,67 \pm 20,11
500	258,33 \pm 13,58	184,67 \pm 19,40
1.000	---	189,00 \pm 31,58
5.000	234,33 \pm 15,70	216,33 \pm 17,95
Potência mutagênica (rev / μg)	X	X

¹óxido de 4-nitroquinolina 0,05 μg / mL

²2-aminoantraceno 0,25 μg / mL

--- concentração não testada

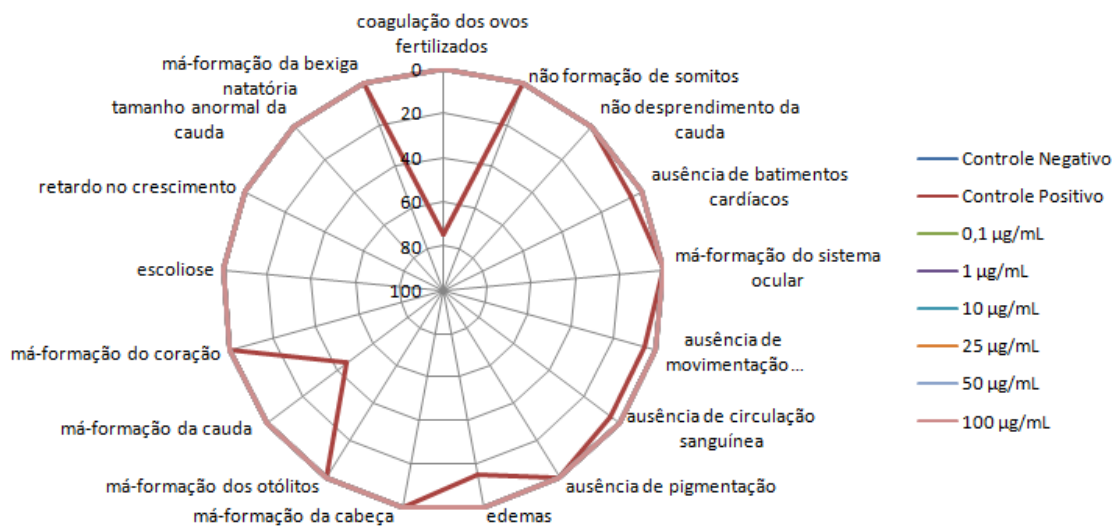
**p < 0,01 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo

X não mutagênico

4.1.4 Avaliação do potencial embrio-tóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

O corante *Acid Black 210* não induziu nenhum dos dezessete *endpoints* analisados (Gráfico 3) durante o desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio* em 144 horas pós-fertilização (hpf) até a concentração máxima de 100 μg / mL (OECD, 2013). O controle positivo utilizado resultou em 100 % de má-formação e morte dos embriões em até 48 horas de experimento e o controle negativo não induziu nos embriões nenhum dos *endpoints* analisados.

Gráfico 3 – Efeito do corante *Acid Black 210* sobre embriões de *D. rerio* após 144 horas de exposição. Os resultados são expressos em porcentagem de ovos afetados de forma cumulativa para cada *endpoint* analisado.



Com o intuito de treinar as técnicas utilizadas na manutenção e manipulação dos peixes e embriões de *Danio rerio*, além de estudar o seu desenvolvimento embrionário foi realizado estágio-sanduiche no *Instituto de Biotecnología* da *Universidad Nacional Autónoma de México* sob supervisão do Prof. Dr. Enrique Salas Vidal através do Programa de Mobilidade Internacional Santander-USP.

Dentre as técnicas aprendidas podem ser citadas a fixação dos embriões para utilização em microscopia confocal, e a retirada do cório e montagem dos embriões para a visualização e análise por outras técnicas de microscopia.

Para a análise dos embriões por microscopia confocal foi utilizada a coloração por Alexa Fluor® 647 conjugada com IgG anti-SOD3 anti-camundongo e anti-coelho. Para observação dos filamentos de actina foi utilizada a coloração por Alexa Fluor® 488 Phalloidin (verde) e para a observação de cadeias de DNA foi utilizada a coloração por Hoechst 33342 (vermelho).

Não foram observadas diferenças significativas por microscopia confocal para o início do desenvolvimento dos embriões de *zebrafish* (48 hpf) após exposição ao corante *Acid Black 210* até a concentração de 5.000 µg / mL quando comparados ao grupo controle. Ainda, após 24 horas de exposição, os embriões foram submetidos a análises por *Western Blot*, também sem variações significativas quando comparados ao grupo controle (dados não apresentados).

Após 96 hpf foi observado que a concentração de 500 µg / mL gerou embriões de menor tamanho quando comparados ao grupo controle ($3,01 \pm 0,079$ e $3,22 \pm 0,18$ mm, respectivamente), com diferença estatística significativa após análise por teste-t de Student e medida realizada pelo programa ImageJ pelo método *freeline* desde a cartilagem de Meckel do embrião até o final de sua notocorda após sua fixação (n = 10). Cabe pontuar que para esta concentração também foi observado mobilidade e formato do vitelo diferentes quando comparados aos do grupo controle, e para todas as concentrações testadas houve um atraso de 24 horas na eclosão.

4.1.5 Avaliação da permeabilidade através do Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

De acordo com as curvas analíticas apresentadas no item 3.5, o corante *Acid Black 210* apresentou permeabilidade de $6,82 \pm 2,71 \times 10^{-6}$ cm / s. Este valor é muito próximo da permeabilidade do fármaco carmazepina ($6,40 \pm 0,20 \times 10^{-6}$ cm / s), que possui fração da dose absorvida em humanos de 100 % (apud CHEN et al., 2008). A análise do controle de placa cafeína resultou em logaritmo de permeabilidade ($\log P_e$) no valor de -4,25, valor próximo ao encontrado por Petit et al. (2016) (-4,49).

4.1.6 Avaliação do risco ecogenotoxicológico da utilização do corante têxtil *Acid Black 210*

Na avaliação do risco ecogenotoxicológico do corante têxtil AB210 foram considerados os três estudos disponíveis na literatura científica: 1. Agrawal et al. (2014): Este trabalho realizou a avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa utilizando *Allium cepa* e toxicidade microbiológica utilizando *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, e *Azotobacter* sp. 2. Cesila (2015): Nesta dissertação do nosso grupo de pesquisa foi realizada a avaliação da citotoxicidade através do ensaio do MTT, mutagenicidade através do Ensaio do Micronúcleo em células HepG2 e ensaio de toxicidade aquática empregando o microcrustáceo *Daphnia similis*. 3. Rocha et al. (2016): Este artigo científico recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa apresenta os resultados da avaliação do risco ecogenotoxicológico do corante AB210 empregando as diferentes abordagens apresentadas na presente Tese.

Através da análise dos critérios de confiabilidade utilizando o método CRED (Tabela 6), os testes de toxicidade microbiológica e de genotoxicidade descritos no trabalho publicado por Agrawal et al. (2014), além do teste de mutagenicidade descrito por Cesila (2015), podem ser classificados como R2 (confiáveis com restrições). Já os

testes de citotoxicidade e ecotoxicidade descritos por Cesila (2015), e os testes de mutagenicidade, genotoxicidade e toxicidade embrionária aguda descritos por Rocha et al. (2016) podem ser classificados como R1 (confiáveis sem restrições). Já para os critérios de relevância (Tabela 7) pode-se concluir que os testes descritos por Agrawal et al. (2014) podem ser classificados como C2 (relevantes com restrições), enquanto os testes descritos por Cesila (2015) e Rocha et al. (2016) podem ser classificados como C1 (relevantes sem restrições).

Seguindo as classificações sugeridas pelo presente estudo e os resultados descritos nos trabalhos analisados, o corante *Acid Black 210* pode ser considerado seguro à luz dos conhecimentos atuais.

Tabela 6 – Critérios de confiabilidade avaliados para os trabalhos toxicológicos disponíveis na literatura utilizando o corante *Acid Black 210*.

Critérios	Literatura Científica							
	AGRAWAL et al., 2014			GESILA, 2015			ROCHA et al., 2016	
	Toxicidade microbiológica ^A	Genotoxicidade (Cometa)	Citotoxicidade (MTT)	Mutagenicidade (Micronúcleo)	Ecotoxicidade (<i>Daphnia similis</i>)	Mutagenicidade (Ames)	Genotoxicidade (Cometa)	Toxicidade embrionária aguda (<i>Danio rerio</i>)
1	Modificado (CP)	Padronizado (CP)	Padronizado (CP)	Padronizado (CP)	Padronizado (CP)	Padronizado (CP)	Padronizado (CP)	Padronizado (CP)
2	CPP	CPP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
3	CNP	CNP	CP	CNP	CP	CP	CP	CP
4	CPP	CPP	CP	CP	CPP	CP	CP	CP
5	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
6	CNP	CNP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
7	CNP	CNP	CNP	CNP	CNP	CNP	CNP	CNP
8	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
9	CPP	CPP	CNP	CNP	CP	CP	CNP	CP
10	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
11	CP	CPP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
12	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
13	CPP	CPP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
14	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
15	CNA	CNP	CNA	CNA	CNA	CNA	CNA	CNP
16	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
17	CP	CNP	CP	CNP	CP	CP	CP	CP
18	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
19	CNP	CNP	CP	CNP	CP	CP	CP	CP
20	CPP	CPP	CPP	CPP	CP	CP	CP	CP

^A*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter* sp.

CP: Critério Preenchido; CPP: Critério Parcialmente Preenchido; CNA: Critério Não Aplicável; CNP: Critério Não Preenchido

Tabela 7 – Critérios de relevância avaliados para os trabalhos toxicológicos disponíveis na literatura utilizando o corante *Acid Black 210*.

Critérios	Literatura Científica							
	AGRAWAL et al., 2014			GESILA, 2015			ROCHA et al., 2016	
	Toxicidade microbiológica ^A	Genotoxicidade (Cometa)	Citotoxicidade (MTT)	Mutagenicidade (Micronúcleo)	Ecotoxicidade (<i>Daphnia similis</i>)	Mutagenicidade (Ames)	Genotoxicidade (Cometa)	Toxicidade embrionária aguda (<i>Danio rerio</i>)
1	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
2	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
3	CNP	CNP	CPP	CP	CP	CP	CP	CP
4	CNP	CP	CP	CP	CNP	CP	CP	CP
5	CNP	CNP	CNP	CNP	CP	CNP	CNP	CP
6	CNP	CNP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
7	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
8	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
9	CP	CNP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
10	CNA	CNA	CNA	CNA	CNA	CNA	CNA	CNP
11	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
12	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
13	CNP	CPP	CNP	CNP	CP	CNP	CNP	CP

^A *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter* sp.

CP: Critério Preenchido; CPP: Critério Parcialmente Preenchido; CNA: Critério Não Aplicável; CNP: Critério Não Preenchido

4.2 Avaliações toxicológicas do corante têxtil *Disperse Violet 93*

4.2.1 Avaliação do potencial genotóxico através do Ensaio do Cometa com células HaCaT

O potencial genotóxico do DV93 foi avaliado através do Ensaio do Cometa com células HaCaT. No presente estudo a viabilidade celular para todas as amostras foi superior a 87 %, determinada através do método de exclusão pelo corante azul de tripano (TICE et al., 2000). Por meio dos resultados obtidos pode-se notar que não houve diferença estatística significativa entre os valores de momento da cauda (*tail moment*) (Gráfico 4) ou intensidade da cauda (*tail intensity*) (Gráfico 5) quando o controle negativo é comparado às doses testadas, o que significa que este corante não induziu danos ao DNA das células HaCaT nas concentrações e condições utilizadas.

Gráfico 4 – Efeito do corante *Disperse Violet 93* sobre o DNA de células HaCaT, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (*tail moment*). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. * $p < 0,05$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.

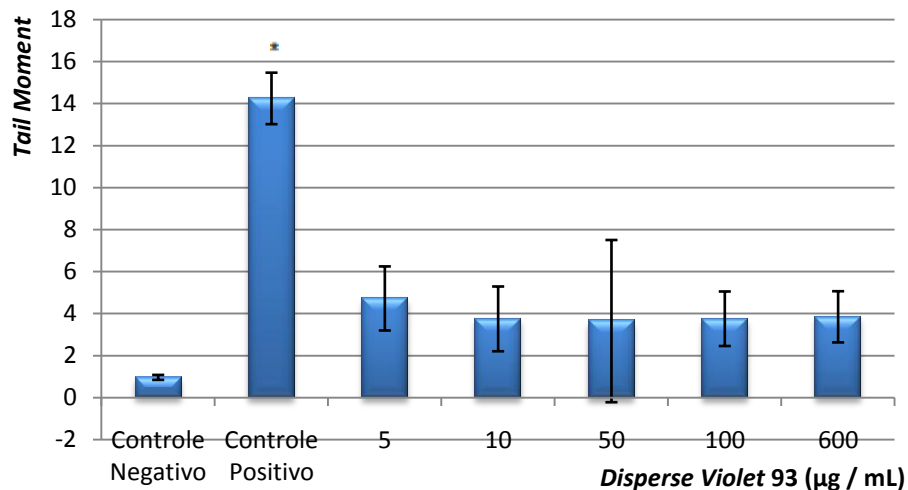
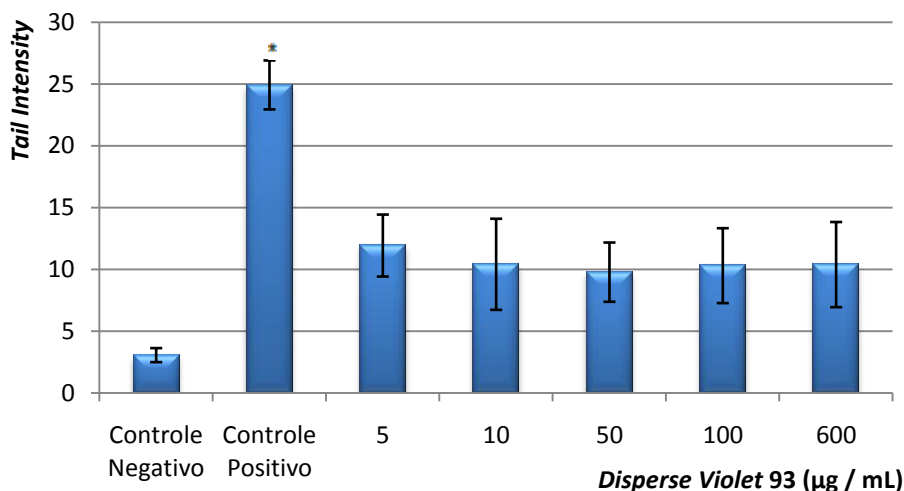


Gráfico 5 – Efeito do corante *Disperse Violet 93* sobre o DNA de células HaCaT, observado pelo teste do cometa após 4 horas de exposição (*tail intensity*). Os resultados são expressos como média e desvio-padrão da triplicata. * $p < 0,05$ estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.



4.2.2 Avaliação do potencial embrio-tóxico através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish (Danio rerio)*

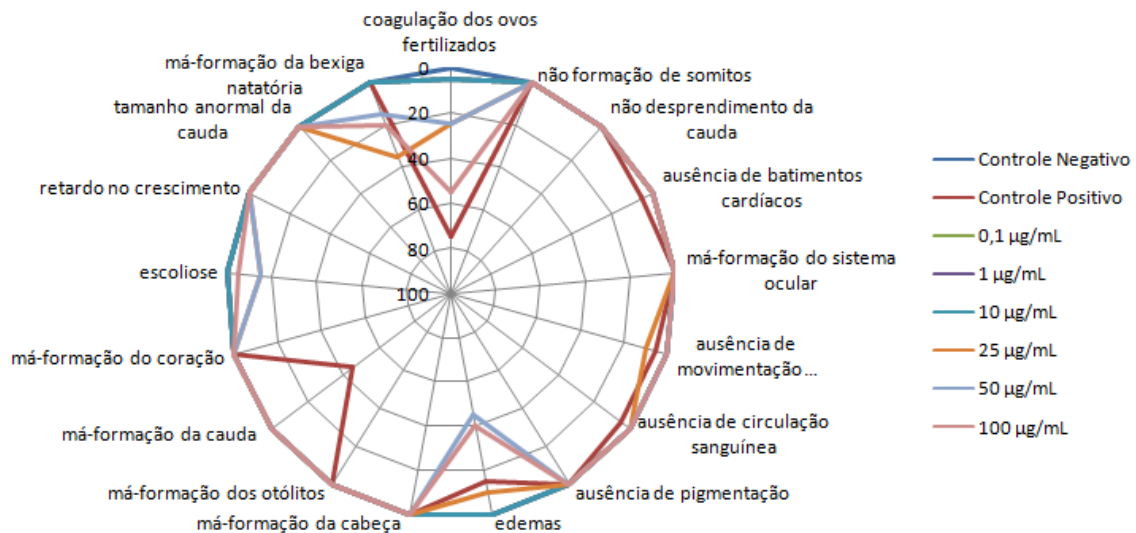
O corante *Disperse Violet 93* (DV93) induziu quatro *endpoints* durante o desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio* em 144 horas pós-fertilização (hpf) até a concentração máxima de 100 µg / mL (OECD, 2013): coagulação de ovos fertilizados, edema do saco vitelínico, escoliose e má-formação da bexiga natatória (Gráfico 6). O controle positivo utilizado resultou em má-formações e 100 % de má-formação e morte dos embriões em até 48 horas de experimento e o controle negativo não induziu nenhum dos *endpoints* analisados.

Somente uma coagulação de ovo fertilizado (5 %) foi observada para as concentrações de 0,1, 1 e 10 µg / mL do corante DV93 em 144 hpf. Já as concentrações de 50 e 100 µg / mL resultaram em 25 e 55 % de morte dos embriões no mesmo período, respectivamente. Ainda, as concentrações de 50 e 100 µg / mL resultaram em 45 e 40 %, respectivamente, de embriões com edema do saco vitelínico, e 15 e 5 %, respectivamente, de embriões com escoliose em 144 hpf. A má-formação da bexiga natatória foi observada em 15 e 20 % para as concentrações de 50 e 100 µg / mL do corante DV93, respectivamente.

Outros *endpoints* observados, por suas características intrínsecas, não puderam ser quantificados com precisão (alterações na pigmentação, tamanho da

cauda e mobilidade do embrião) a partir da concentração de 10 µg / mL do corante DV93 em 48 hpf.

Gráfico 6 – Efeito do corante *Disperse Violet* 93 sobre embriões de *D. rerio* após 144 horas de exposição. Os resultados são expressos em porcentagem de ovos afetados de forma cumulativa para cada *endpoint* analisado.



4.2.3 Avaliação do risco ecogenotoxicológico preliminar da utilização do corante têxtil *Disperse Violet* 93

Ainda que não tenham sido utilizados os critérios de confiabilidade e relevância do método CRED, os resultados de toxicidade aguda em embriões de *Danio rerio* apresentados no presente estudo, em conjunto com os resultados de mutagenicidade descritos por Umbuzeiro et al. (2005) para a linhagem de *S. typhimurium* YG1041 indicam que o corante *Disperse Violet* 93 apresenta ecogenotoxicidade importante, necessitando de avaliações nos demais níveis tróficos para que uma avaliação do risco completa do uso deste corante seja realizada.

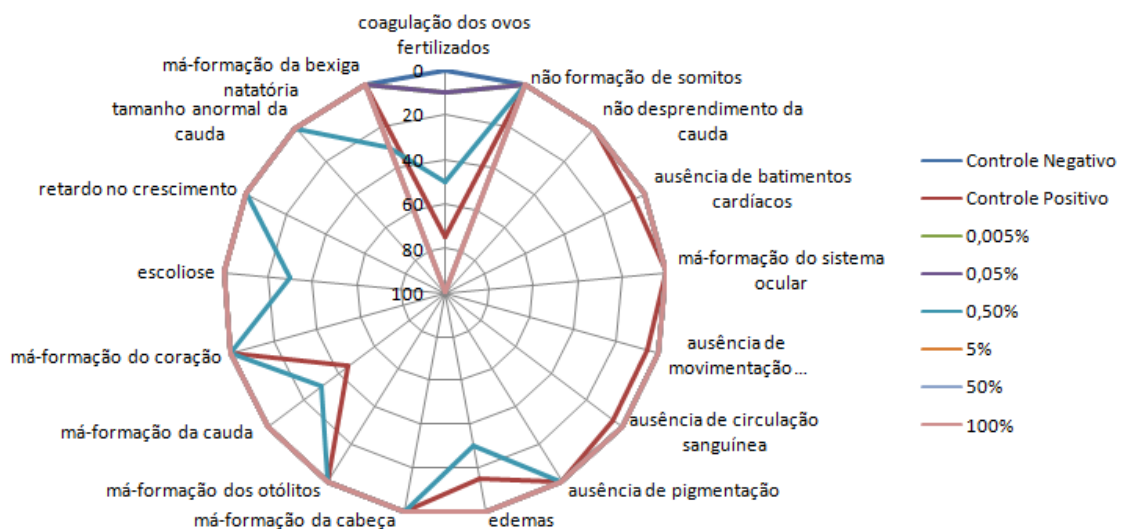
4.3 Avaliação do potencial embrio-tóxico de efluente de curtume pré-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

O efluente de curtume analisado antes do tratamento prévio ao descarte em leito de rio (dados do tratamento não informados pela indústria) induziu seis *endpoints* durante o desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio* em 144 horas pós-fertilização (hpf): coagulação de ovos fertilizados, edema do saco vitelínico, escoliose, má-formação da cauda, má-formação da bexiga natatória e má-formação de outros órgãos

de forma inespecífica (Gráfico 7). O controle positivo utilizado resultou em má-formações e 100 % de morte dos embriões em até 48 horas de experimento e o controle negativo resultou em coagulação de dois ovos fertilizados.

Todos os ovos fertilizados apresentaram coagulação em até 5 % do efluente diluído em água deionizada em 24 hpf. A concentração de 0,5 % do efluente resultou em 50 % de coagulação em 144 hpf. Já as concentrações de 0,05 % e 0,005% resultaram em 10 % de coagulação em 144 hpf. Ainda, a concentração de 0,5 % do efluente resultou em 30 % de embriões com escoliose em 144 hpf, e 30 % de embriões afetados para os demais *endpoints* observados em 144 hpf. Cabe ressaltar que nesta concentração os embriões ainda demonstraram estar fragilizados e com movimentação irregular da cauda (*endpoints* que não puderam, por suas características intrínsecas, ser quantificados com precisão).

Gráfico 7 – Efeito do efluente pré-tratamento sobre embriões de *D. rerio* após 144 horas de exposição. Os resultados são expressos em porcentagem de ovos afetados de forma cumulativa para cada *endpoint* analisado.



4.4 Avaliação do potencial embrio-tóxico de efluente de curtume pós-tratamento através do Ensaio de Toxicidade Aguda com Embriões de *Zebrafish* (*Danio rerio*)

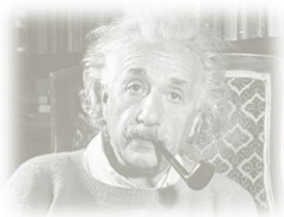
O efluente de curtume analisado após o tratamento prévio ao descarte em leito de rio (dados do tratamento não informados pela indústria) induziu seis *endpoints* durante o desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio* em 144 horas pós-fertilização (hpf): coagulação de ovos fertilizados, não desprendimento da cauda, edema do saco vitelínico, escoliose, ausência de movimentação espontânea e má-formação da bexiga natatória (Gráfico 8). O controle positivo utilizado resultou em má-formações e 100 %

“O paraíso é um conto de fadas para pessoas com medo do escuro.”

Stephen Hawking

Discussão

-V-

DISCUSSÃO

Considerando que a utilização por parte das indústrias têxteis de azocorantes contendo nitrosaminas ou aminas aromáticas com potencial mutagênico pode gerar efluentes contaminados e apresentar risco em potencial para a saúde humana e para o meio ambiente, e que a literatura científica encontra-se defasada em informações sobre este risco toxicológico, faz-se necessário estudos específicos de genotoxicidade e mutagenicidade que possam direcionar a criação de leis específicas para a proteção da saúde humana e ambiental.

Nosso grupo de pesquisa vem apresentando dados relevantes sobre a mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de azocorantes há alguns anos. Chequer et al. (2009) relatam a dose-resposta observada para os corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Orange 1* em ensaios de micronúcleo em linfócitos e em células HepG2 em concentrações superiores a 1 µg / mL e 2 µg / mL, respectivamente. Ferraz et al. (2011) apresentam resultados de mutagenicidade pelo teste de Ames para os corantes *Disperse Red 1* e *Disperse Red 13*, observando que ambos induziram mutações em linhagens de *Salmonella* spp. Ferraz, Grando e Oliveira (2011) relatam a mutagenicidade e citotoxicidade do azocorante *Disperse Orange 1*, e outros estudos do grupo de pesquisa apresentam dados da avaliação toxicogenética e ecotoxicológica dos corantes têxteis *Direct Black 38* e *Reactive Blue 15* (OLIVEIRA, 2013).

Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula e tecido específicos, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos em uma única célula, e conseqüentemente em determinada subpopulação celular, é de grande importância para a avaliação de compostos genotóxicos (GONTIJO; TICE, 2003).

Além destas especificidades, este teste é de relativo baixo custo e difere de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas. O fato do ensaio possibilitar acesso às quebras do DNA de uma única célula contribui para que poucos milhares de células sejam suficientes para sua realização (GONTIJO; TICE, 2003).

Os resultados apresentados nesta Tese indicam que não há diferença estatística significativa entre os valores de *tail moment* e *tail intensity* entre as doses

testadas e o controle negativo para o corante *Acid Black 210*, o que significa que o mesmo não induziu danos ao DNA das células HepG2.

Quanto às análises de mutagenicidade pelo teste de Ames, foram realizados ensaios na ausência e na presença de ativação metabólica (S9), já que de acordo com Rajaguru et al. (2001) alguns corantes necessitam de ativação metabólica para indução da mutagenicidade. Umbuzeiro et al. (2005) também verificaram que a adição de S9 é capaz de aumentar a resposta mutagênica do corante *Disperse Blue 291*.

Os resultados apresentados nesta Tese também indicam que não houve a indução da mutagenicidade nas linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100 para o corante *Acid Black 210* nas concentrações e condições testadas, mesmo na presença de ativação metabólica.

Os possíveis sub-produtos de degradação do *Acid Black 210* vêm sendo estudados pela aluna Elisa Maria Christovam sob supervisão da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – Araraquara-SP. Foi observada a presença dos compostos 2-naftilamina, 2,6-dimetilanilina e 4-nitroanilina em amostras de efluentes de um curtume do Córrego do Liso (São Sebastião do Paraíso-MG) por LC-ESI-MS/MS QTrap e RMN (dados não publicados), indicando que a degradação natural do corante *Acid Black 210* ocorre pela quebra das ligações azo (N=N).

Aßmann et al. (1997) observaram que a 4-nitroanilina possui atividade mutagênica na linhagem de *S. typhimurium* TA98 pelo teste de Ames somente na presença de metabolização exógena (S9). Inami, Okazawa e Mochizuki (2009) observaram que aminas e amidas aromáticas, incluindo a 2-naftilamina, apresentam atividade mutagênica na linhagem de *S. typhimurium* TA98 na presença de ativação química e metabólica. Kirkland et al. (2012) não observaram atividade mutagênica para a 2,6-dimetilanilina até a concentração máxima de 5.000 µg / placa nas linhagens de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 e TA1537 mesmo após ativação metabólica, ainda que este composto seja considerado carcinogênico para roedores.

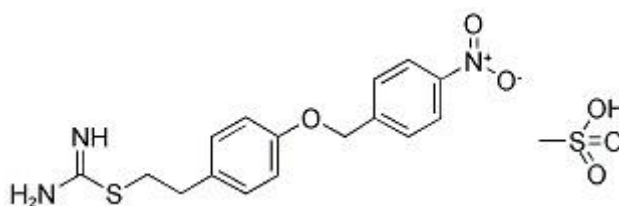
Estes estudos são compatíveis com os resultados de mutagenicidade observados no presente estudo. Ainda, a degradação proposta por Agrawal et al. (2014) através da bactéria *Providencia* sp. SRS82 apresenta outros compostos intermediários na degradação deste corante (benzeno, anilina, 1-naftol, naftaleno, dentre outros), indicando a possibilidade da degradação do *Acid Black 210* não ocorrer somente pelo mecanismo de quebra nas ligações azo, ou ocorrer com a formação de intermediários rapidamente degradados em outros compostos quando o corante é submetido à metabolização.

Quanto à avaliação da ecotoxicidade, o primeiro corante a ser testado através do teste de toxicidade aguda com embriões do *zebrafish* foi a henna (corante de cabelo), de uso comum pela população asiática e encontrada em efluentes industriais na Índia e na China (MANJUNATHA et al., 2014). Dentre as má-formações observadas pelo autores após 96 horas de experimentação estão o retardo na eclosão, circulação sanguínea lenta, edema pericárdico e deformação caudal, nas concentrações de 100, 200 e 275 μM de henna (MANJUNATHA et al., 2014).

No presente estudo foi observada a ausência de efeito agudo em embriões de *zebrafish* até a concentração de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, dose máxima a ser testada de acordo com a OECD, para o corante *Acid Black 210*. Porém, devido às observações de atraso na eclosão, tamanho de cauda reduzido, mobilidade alterada e formato do vitelo aparentemente alterado na concentração de 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, e considerando que todos estes processos possuem o citoesqueleto como estrutura celular em comum, há a necessidade de estudos que verifiquem a influência deste corante durante o processo de formação muscular e esquelética em *D. rerio*. Para que essa avaliação possa ser realizada, a sugestão é estudar quantitativamente os mecanismos envolvidos com o processo de neurotoxicidade em embriões de *D. rerio* utilizando plataformas analíticas de sistemas de alta performance (*high-throughput screening*) através de videomonitoramento automatizado associado à ensaios de expressão gênica. Esses estudos constituem a base do projeto de Pós-Doutorado submetido recentemente à FAPESP sob o protocolo de número 2016/05469-5.

É interessante notar que o *Acid Black 210* possui grupamentos químicos estruturalmente semelhantes ao mesilato KB-R7943 (número CAS 182004-65-5) (Figura 6). Este composto é um inibidor seletivo e reversível de NCKX em células que expressam NCX1, responsável pelo transporte catiônico de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2015). Lamason et al. (2005) relatam que o NCKX5 (SLC24A5) afeta a pigmentação do *zebrafish*. O ortólogo humano é muito similar em sequência e função nos seres humanos, sugerindo um papel importante deste gene na pigmentação humana (LAMASON et al., 2005).

Figura 8 – Estrutura química do composto mesilato KB-R7943



Fonte: <http://www.scbt.com/datasheet-202681-kb-r7943-mesylate.html>

O ensaio de permeabilidade realizado reforça a idéia de que mesmo compostos altamente hidrossolúveis devem passar por testes toxicológicos, já que podem ser absorvidos e exercer efeitos no meio ambiente e/ou organismos vivos. O corante *Acid Black 210* apresentou permeabilidade semelhante, nas mesmas condições testadas, à do fármaco carbamazepina, altamente absorvido pelos seres humanos. Ressalta-se que este teste está relacionado à absorção passiva dos compostos, e não leva em consideração possíveis mecanismos de efluxo, enzimáticos ou de transporte ativo. Assim, de acordo com o critério de absorção gastrointestinal descrito em Petit et al. (2016), este corante provavelmente não seria absorvido por seres humanos pela via oral, ainda que seja permeável às células.

A avaliação de risco realizada para o corante *Acid Black 210* levou em consideração todos os resultados toxicológicos disponíveis na literatura científica para este corante. Primariamente, de acordo com o método CRED, os trabalhos descritos na presente Tese (ROCHA et al., 2016) e os realizados por Cesila (2015) foram considerados confiáveis e relevantes. De forma complementar podem ser observados os resultados publicados por Agrawal et al. (2014). Assim, todos os níveis tróficos foram avaliados e o corante pode ser considerado seguro do ponto de vista ecogenotoxicológico à luz dos conhecimentos atuais.

No presente estudo, não foi observada diferença estatística significativa entre os valores de *tail moment* e *tail intensity* entre as doses testadas e o controle negativo para o corante *Disperse Violet 93* pelo Ensaio do Cometa. Já quanto à sua toxicidade aguda em embriões de *zebrafish*, este corante mostrou-se embrio-tóxico, induzindo coagulação de ovos fertilizados, edema do saco vitelínico, escoliose e má-formação da bexiga natatória em 144 hpf.

Este corante também possui mutagenicidade descrita para a linhagem de *S. typhimurium* YG1041 pelo teste de Ames em 4.600 revertentes / μg (UMBUZEIRO et al., 2005). Há a necessidade de uma avaliação toxicológica mais completa em outros níveis tróficos, já que este corante já foi identificado em amostras coletadas no Ribeirão dos Cristais-SP (UMBUZEIRO et al., 2005) e continua sendo utilizado pelas indústrias têxteis devido à ausência de legislação específica.

Ainda que não tenham sido utilizados os critérios de confiabilidade e relevância do método CRED para realizar a avaliação do risco do uso do *Disperse Violet 93* pelas indústrias têxteis, os resultados observados através de uma abordagem integrada indicam que este corante apresenta ecogenotoxicidade importante, necessitando de avaliações nos demais níveis tróficos para que uma avaliação do risco completa do uso deste corante seja realizada.

Estudos realizados por outros grupos de pesquisa apontaram recentemente a contaminação de águas em regiões brasileiras onde a indústria têxtil mantém suas atividades. Manzano et al. (2015) avaliaram o potencial genotóxico das águas do Ribeirão Tatu (Limeira-SP), impactadas com os efluentes doméstico, industrial e agrícola através do ensaio do cometa com células HTC. Em 2003, Matsumoto et al. utilizaram o ensaio do cometa em células CHO-K1 para avaliar o potencial genotóxico das águas do Córrego dos Bagres (Franca-SP), impactadas com o efluente de curtumes instalados na região (MATSUMOTO et al., 2003).

Lemos, Oliveira e Lemos (2011) relatam o potencial mutagênico de águas de superfície do rio Cadeia e Feitoria-RS impactadas com efluentes de curtumes e indústrias têxteis através do Ensaio do Micronúcleo com células V79 e linfócitos humanos. Mitteregger et al. (2007) relatam o potencial genotóxico de águas e sedimentos coletados em Estância Velha-RS impactados com efluentes de indústrias têxteis através da utilização de *Allium cepa*, além de observaram toxicidade em testes com *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella azteca*. Na Índia, Alam et al. (2010) relatam a mutagenicidade através do Teste de Ames com as linhagens de *S. typhimurium* TA98, TA97a e TA102, além de genotoxicidade através do teste com *Escherichia coli* K-12, em efluentes de curtume utilizados para a irrigação de lavouras.

No presente estudo foi realizada a coleta de amostras de efluente de curtume pré e pós-tratamento industrial. A Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes de acordo com cada classificação. De acordo com os relatórios de ensaio realizados pela CETESB, o pH da amostra coletada foi de 8,05 para o efluente pré-tratado, subindo para 12,46 no efluente pós-tratado (estes dados constam do laudo de análise da CETESB que não foram aqui divulgados por questões éticas). Este último valor encontra-se em desacordo com a legislação vigente, que preconiza uma faixa de pH entre 6,0 e 9,0 unidades.

Ainda, a demanda biológica de oxigênio (DBO) para o efluente pós-tratamento foi de 45 mg / L O₂, valor muito superior ao de 3 mg / L O₂ descrito como máximo valor permitido para águas de classe 1 (que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado, ou ainda à recreação de contato primário, irrigação de hortaliças consumidas cruas) e de 10 3 mg / L O₂ descrito como máximo valor permitido para águas de classe 3 (que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento avançado, ou ainda à recreação de contato secundário, pesca amadora e dessedentação de animais). Cabe ressaltar que a própria legislação permite um limite mais elevado para DBO no caso

de águas de classe 3, caso o estudo da capacidade de autodepuração do corpo receptor demonstre que as concentrações mínimas de oxigênio dissolvido previstas não serão desobedecidas.

A análise de metais para o efluente pós-tratamento, incluindo cádmio, chumbo, cobre, ferro, níquel e zinco, além das análises de sólidos sedimentáveis, óleos e graxas, encontram-se em acordo com a legislação vigente (dados não apresentados). A título de curiosidade, a Tabela 8 apresenta uma comparação de padrões de lançamento de efluentes oriundos de atividades de curtume entre diferentes países (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008).

Os ensaios de toxicidade aguda em embriões de *zebrafish* realizados apontam a alta toxicidade destes efluentes antes do tratamento realizado. Porém, o descarte pós-tratamento mostrou-se menos tóxico para o meio ambiente. Cabe ressaltar que esta toxicidade depende, ainda, da capacidade de diluição do corpo receptor, incluindo fatores como profundidade, volume, e correnteza da água.

Tabela 8 – Comparação de padrões de lançamento de efluentes oriundos de atividades de curtume de vários países (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008).

Parâmetro (mg / L)	Brasil	Dinamarca	França	Alemanha	Hungria	Índia	Itália	Países Baixos	Suíça	UK	Estados Unidos	Japão
pH (unidade)	5,0 – 9,0	6,5 – 8,5	5,5 – 8,5	6,5 – 9,5	5,0 – 10,0	5,5 – 9,0	5,5 – 9,5	6,5 – 8,5	5,5 – 8,5	6,0 – 9,0	6,0 – 9,0	5,0 – 4,0
Temperatura (°C)	40	30	30	35	---	---	30	25	30	25	---	---
DBO	120	---	40 – 200	20 – 25	---	30	40	50	20	20 – 130	40	160
DQO	360	---	---	200 – 250	---	250	160	---	---	---	---	160
Sólidos em suspensão	130	30	30-100	---	50 – 150	100	80	80	20	30 – 80	60	200
Cromo total	0,5	---	---	---	---	---	---	0,05	---	---	1,0	2,0
Amônia	1,5	2,0	15 – 80	5,0 – 10	2,0 – 3,0	---	15	---	---	100	---	---
Fósforo	1,0	---	---	---	---	---	10	---	---	---	---	10
Óleos e graxas	30	5	---	---	8 – 50	---	20	---	20	---	---	30

“A verdade pode ser intrigante. Pode dar algum trabalho lidar com ela. Pode ser contraintuitiva. Ela pode contradizer preconceitos profundamente enraizados. Pode não se coadunar com o que queremos desesperadamente que seja verdade. Mas nossas preferências não determinam o que é verdade.”

Carl Sagan

Conclusões

-VI-

CONCLUSÕES

O corante *Acid Black 210* não apresentou genotoxicidade em células HepG2, nem mutagenicidade em linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100 mesmo na presença de metabolização. Ainda, não apresentou toxicidade morfofisiológica em embriões de *zebrafish*. Pelos resultados obtidos e pela avaliação do risco do uso do *Acid Black 210* pelas indústrias têxteis, não há indícios de que este corante apresente ecogenotoxicidade que justifique sua retirada do mercado ou legislação específica. Este corante pode ser considerado seguro à luz dos conhecimentos atuais.

Por outro lado, o corante *Disperse Violet 93* apresentou toxicidade morfofisiológica em embriões de *zebrafish*. Considerando que na literatura científica também consta sua mutagenicidade em linhagem de *S. typhimurium* YG1041, este corante necessita de avaliações nos demais níveis tróficos para que uma avaliação do risco seja realizada.

Estes resultados ressaltam a importância da realização de estudos toxicológicos visando fornecer subsídios para a realização de avaliações do risco do uso de corantes, já que estes se encontram em exposição constante aos seres vivos e ao meio ambiente.

“Ninguém se torna iluminado por imaginar figuras de luz, mas sim por tornar consciente a escuridão.”

Carl Jung

Referências

ÅGERSTRAND, M.; BREITHOLTZ, M. RUDÉN, C. Comparison of four different methods for reliability evaluation of ecotoxicity data: A case study of non-standard test data used in environmental risk assessments of pharmaceutical substances. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, n. 17, 2011

AGRAWAL, S.; TIPRE, D.; PATEL, B.; DAVE, S. Optimization of triazo Acid Black 210 dye degradation by *Providencia* sp. SRS82 and elucidation of degradation pathway. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 110-119, 2014

ALAM, M. Z.; AHMAD, S.; MALIK, A.; AHMAD, M. Mutagenicity and genotoxicity of tannery effluents used for irrigation at Kanpur, India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1620-1628, 2010

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA, 2012. **Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Disponível em: <<https://www.standardmethods.org/>>

ANLIKER, R. Ecotoxicology of dyestuffs – Joint effort by industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 3, p. 59-74, 1979

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, p. 117-152, 2006

ABMANN, N.; EMMRICH, M.; KAMPF, G.; KAISER, M. Genotoxic activity of important nitrobenzenes and nitroanilines in the Ames test and their structure-activity relationship. **Mutation Research**, v. 395, p. 139-144, 1997

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). Disponível em: <www.abiquim.org.br/comissao/setorial/corantes-pigmentos/especificidade/sobre-o-produto>. Acesso em: 29 jul. 2016

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). Disponível em: <www.abit.org.br/Abit.aspx#4>. Acesso em: 27 mar. 2015

BAFANA, A.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: Past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, p. 350-370, 2011

BALLS, M.; STRAUGHAN, D. W. The three Rs of Russell & Burch and the testing of biological products. **Developments in Biological Standardization**, v. 86, p. 11-18, 1996

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

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Brasília**, 2005

BRASIL. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Brasília**, 2011

BRAZILIAN LEATHER BOOK, 147 p., **Centro das Indústrias de Curtume do Brasil (CICB)**, 2014, disponível em: <www.brazilianleather.com.br>

BRÜSCHWEILER, B. J.; KÜNG, S.; BÜRGI, D.; MURALT, L.; NYFELER, E. Identification of non-regulated aromatic amines of toxicological concern which can be cleaved from azo dyes used in clothing textiles. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 263-272, 2014

BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T.; CARR, G. J.; CENIJN, P.; FOCHTMAN, P.; GOURMELON, A.; HÜBLER, N.; KLEENSANG, A.; KNÖBEL, M.; KUSSATZ, C.; LEGLER, J.; LILLICRAP, A.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; POLLEICHTNER, C.; RZODECZKO, H.; SALINAS, E.; SCHNEIDER, K. E.; SCHOLZ, S.; BRANDHOF, E. J. V. D.; VEN, L. T. M. V. D.; WALTER-ROHDE, S.; WEIGT, S.; WITTERS, H.; HALDER, M. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 469-511, 2014

CESILA, C. A. **Avaliação do potencial mutagênico de corantes têxteis por meio do ensaio do micronúcleo**. Ribeirão Preto, 89 p., Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Toxicologia, 2015

CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C. L.; BALIMANE, P. V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 1511-1520, 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 – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 676, p. 83-86, 2009

CHEQUER, F. M. D.; OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. Textile dyes: Dyeing process and environmental impact. In: GUNAY, M. **Eco-friendly textile dyeing and finishing**. Rijeka: InTech, p. 151-176, 2013

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

CICB – CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL. Disponível em: <www.cicb.org.br>. Acesso em: 25 abr 2016

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; WARNER, J. R.; MYERS, L. E. HUGHES, T. J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: II. With exogenous activation. **Mutation Research**, v. 253, p. 149-159, 1991

- COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Conformations constrains in nuclear DNA. **Journal of Cell Science**, v. 22, p. 287-302, 1976.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008
- FERRAZ, E. R. A.; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 628-633, 2011
- FERRAZ, E. R. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F. M. D.; ZANONI, M. V. B.; DORTA, D. J.; OLIVEIRA, D. P. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay and *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 489-497, 2011
- GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 203-210, 2004
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do Cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 247-279, 2003
- GUARATINI, T.; CARDOZO, K. H. M.; PAVANELLI, D. D.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Ecotoxicologia. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 125-141, 2008
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000
- HELLMAN, B.; VAGHEF, H.; BOSTRÖM, 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
- HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. R.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; COLLINS, J. E.; HUMPHRAY, S.; MCLAREN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; SEALY, I.; CACCAMO, M.; CHURCHER, C.; SCOTT, C.; BARRETT, J. C.; KOCH, R.; RAUCH, G. J.; WHITE, S.; CHOW, W.; KILIAN, B.; QUINTAIS, L. T.; GUERRA-ASSUNÇÃO, J. A.; ZHOU, Y.; GU, Y.; YEN, J.; VOGEL, J. H.; EYRE, Y.; REDMOND, S.; BANERJEE, R.; CHI, J.; FU, B.; LANGLEY, E.; MAGUIRE, S. F.; LAIRD, G.K.; LLOYD, D.; KENYON, E.; DONALDSON, S.; SEHRA, H.; ALMEIDA-KING, J.; LOVELAND, K.; TREVANION, S.; JONES, M.; QUAIL, M.; WILLEY, D.; HUNT, A.; BURTON, J.; SIMS, S.; MCLAY, K.; PLUMB, B.; DAVIS, J.; CLEE, C.; OLIVER, K.; CLARK, R.; RIDDLE, C.; ELLIOT, D.; THREADGOLD, G.; HARDEN, G.; WARE, D.; BEGUM, S.; MORTIMORE, B.; KERRY, G.; HEALTH, P.; PHILLIMORE, B.; TRACEY, A.; CORBY, B.; DUNN, M.; JOHNSON, C.; WOOD, J.; CLARK, S.; PELAN, S.; GRIFFITHS, G.; SMITH, M.; GLITHERO, R.; HOWDEN, P.; BARKER, N.; LLOYD, C.; STEVENS, C.; HARLEY, J.; HOLT, K.; PANAGIOTIDIS, G.; LOVELL, J.; BEASLEY, H.; HENDERSON, C.; GORDON, D.; AUGER, K.; WRIGHT, D.; COLLINS, J.; RAISEN, C.; DYER, L.; LEUNG, K.; ROBERTSON, L.; AMBRIDGE, K.; LEONGAMORNERT, D.; MCGUIRE, S.; GILDERTHROP, R.; GRIFFITHS, C.; MANTHRAVADI, D.; NICHOL, S.; BARKER, G.; WHITEHEAD, S.; KAY, M.; BROWN, J.; MURNANE, C.; GRAY, E.; HUMPHRIES, M.; SYCAMORE, N.; BARKER, D.;

SAUNDERS, D.; WALLIS, J.; BABBAGE, A.; HAMMOND, S.; MASHREGHI-MOHAMMADI, M.; BARR, L.; MARTIN, S.; WRAY, P.; ELLINGTON, A.; MATTHEWS, N.; ELLWOOD, M.; WOODMANSEY, R.; CLARK, G.; COOPER, J.; TROMANS, A.; GRAFHAM, D.; SKUCE, C.; PANDIAN, R.; ANDREWS, R.; HARRISON, E.; KIMBERLEY, A.; GARNETT, J.; FOSKER, N.; HALL, R.; GARNER, P.; KELLY, D.; BIRD, C.; PALMER, S.; GEHRING, I.; BERGER, A.; DOOLEY, C. M.; ERSAN-ÜRÜN, Z.; ESER, C.; GEIGER, H.; GEISLER, M.; KAROTKI, L.; KIRN, A.; KONANTZ, J.; KONANTZ, M.; OBERLÄNDER, M.; RUDOLPH-GEIGER, S.; TEUCKE, M.; LANZ, C.; RADDATZ, G.; OSOEGAWA, K.; ZHU, B.; RAPP, A.; WIDAA, S.; LANGFORD, C.; YANG, F.; SCHUSTER, S.C.; CARTER, N. P.; HARROW, J.; NING, Z.; HERRERO, J.; SEARLE, S. M.; ENRIGHT, A.; GEISLER, R.; PLASTERK, R. H.; LEE, C.; WESTERFIELD, M.; DE JONG, P. J.; ZON, L. I.; POSTLETHWAIT, J. H.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; HUBBARD, T. J.; ROEST CROLIUS, H.; ROGERS, J.; STEMPEL, D. L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498-503, 2013

INAMI, K.; OKAZAWA, M.; MOCHIZUKI, M. Mutagenicity of aromatic amines and amides with chemical models for cytochrome P450 in Ames assay. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 986-991, 2009

JADHAV, J. P.; KALYANI, D. C.; TELKE, A. A.; PHUGARE, S. S.; GOVINDWAR, S. P. 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.; 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**, v. 33, p. 193-200, 1996

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 1007-1010, 1998

KANT, R. Textile dyeing industry: An environmental hazard. **Natural Science**, v. 4, p. 22-26, 2012

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic-development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995

KIRKLAND, D.; BALLANTYNE, M.; HARLFINGER, S.; WILL, O.; JAHNEL, U.; KRAUS, A.; VAN DORP, C. Further investigations into the genotoxicity of 2,6-xylydine and one of its key metabolites. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 151-159, 2012

KLIMISCH, H. J.; ANDREAE, M.; TILLMANN, U. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 1-5, 1997

LAMASON, R. L.; MOHIDEEN, M. A. P. K.; MEST, J. R.; WONG, A. C.; NORTON, H. L.; AROS, M. C.; JURYNEC, M. J.; MAO, X.; HUMPHREVILLE, V. R.; HUMBERT, J. E.; SINHA, S.; MOORE, J. L.; JAGADEESWARAN, P.; ZHAO, W.; NING, G.; MAKALOWSKA, I.; MCKEIGUE, P. M.; O'DONNELL, D.; KITTLES, R.; PARRA, E. J.; MANGINI, N. J.; GRUNWALD, D. J.; SHRIVER, M. D.; CANFIELD, V. A.; CHENG, K.

- C. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. **Science**, v. 310, p. 1782-1786, 2005
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1-20, 2007
- LEMOS, A. O.; OLIVEIRA, N. C. D.; LEMOS, C. T. *In vitro* micronuclei tests to evaluate the genotoxicity of surface water under the influence of tanneries. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 761-766, 2011
- LOPES, M. R. S.; MARTINEZ, S. T.; CHAVES, V. C.; ROCHA, A. S. R.; AMARANTE, L. Determinação por HPLC de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 954-956, 2007
- MA, M.; TONG, Z.; WANG, Z.; ZHU, M. 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, p. 81-99, 2008
- MANJUNATHA, B.; WEI-BING, P.; KE-CHUN, L.; MARIGOUDAR, S. R.; XI-QIANG, C.; XI-MIN, W.; XUE, W. The effects of henna (hair dye) on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 10361-10367, 2014
- MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M.; MENEGÁRIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Sciences and Pollution Research**, v. 22, p. 1399-1407, 2015
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALLAGUTI, M. I.; MARIN-MORALES, M. A. Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the *in vitro* Comet assay. **Cytologia**, v. 68, p. 395-401, 2003
- MAZZO, T. M.; SACZK, A. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. 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
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/EFABF603/Ofi_08_2008DIQUAIBAM_A_Completo.pdf>
- MITTEREGGER JR., H.; SILVA, J.; ARENZON, A.; PORTELA, C. S.; FERREIRA, I. C. F. S.; HENRIQUES, J. A. P. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. **Chemosphere**, v. 67, p. 1211-1217, 2007

MOERMOND, C. T. A.; KASE, R.; KORKARIC, M.; ÅGERSTRAND, M. CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, p. 1-13, 2016

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

MOTULSKY, H. GraphPad Prism® Version 5.0: Statistics Guide. **GraphPad Software Incorporation**, 2007

MURRELL, J. N. The **theory of the electronic spectra of organic molecules**. Londres: Chapman and Hall, 1963

NAGEL, R. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – A general model in ecotoxicology and toxicology. **Altex**, v. 19, s. 1, 2002

NERI, M.; MILAZZO, D.; UGOLINI, D.; MILIC, M.; CAMPOLONGO, A.; PASQUALETTI, P.; BONASSI, S. Worldwide interest in the comet assay: A bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30, p. 155-163, 2015

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing Chemicals, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **Guideline 236**, 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

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v. 117, p. 79-92, 1989

OLIVEIRA, G. A. R. **Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis**. Ribeirão Preto, 98 p., Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Toxicologia, 2013

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. **International Journal of Radiation Biology**, v. 52, p. 683-691, 1987

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

PACHECO, J. W. F. **Curtumes**. São Paulo: CETESB, 76 p., 2005, disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br>

PETIT, C.; BUJARD, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; CRETOON, S.; HOURIET, J.; CHRISTEN, P.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J. L. Prediction of the passive intestinal absorption of medicinal plant extract constituents with the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). **Planda Medica**, v. 82, p. 424-431, 2016

PFIZER, **Fenazopiridina**. Maria Rita Maniezi. Cotia-SP, 2008. Bula de remédio

- 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, p. 123-135, 2012
- 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**, v. 97, p. 103-116, 1982
- RAJAGURU, P.; KALPANA, R.; HEMA, A.; SUBA, S.; BASKARASETHUPATHI, B.; KUMAR, P. A.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 316-322, 2001
- RAZIN, S. V.; GROMOVA, I. I., IAROVAIA, O. V. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: New approaches to clarify the old questions. In: **Nuclear matrix: Structural and functional organization**. California: Academic Press, p. 405-448, 1995
- 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, p. 21-27, 2003
- ROCHA, O. P.; CESILA, C. A.; CHRISTOVAM, E. M.; BARROS, S. B.; ZANONI, M. V. OLIVEIRA, D. P. Ecotoxicological risk assessment of the "Acid Black 210" dye. **Toxicology**, *in press*, 2016
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London, Methuen & Co., 1959
- RYDBERG, B. Detection of induced DNA strand breaks with improved sensitivity in human cells. **Radiation Research**, v. 81, p. 492-495, 1980
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-223, 2003
- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. KB-R7943 Mesylate (CAS 182004-65-5), 2015, disponível em: <www.scbt.com/pt/datasheet-202681-kb-r7943-mesylate.html>. Acesso em: 20 mar. 2015
- SÃO PAULO. Lei nº 997, de 31 de maio de 1976. Dispõe sobre o Controle da Poluição do Meio Ambiente. **São Paulo**, 1976
- SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.; VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – Applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 15, p. 394-404, 2008
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988
- SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 89, p. 13-24, 2008

- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000
- TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P.; 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**, v. 21, p. 1650-1655, 2007
- UMBUZEIRO, G. D. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; OLIVEIRA, D. P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, v. 60, p. 55-64, 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. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 81-112, 2003
- UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 02/61/EC, de 19 de julho de 2002. Sobre a restrição na venda e uso de substâncias e preparações (azocorantes). **União Europeia**, 2002
- UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 10/63/EU, de 22 de setembro de 2010. Sobre a proteção dos animais utilizados para propósitos científicos. **União Europeia**, 2010
- UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 86/609/CEE, de 24 de novembro de 1986. Relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares, e administrativas dos Estados-membros respeitantes à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos. **Bruxelas**, 1986
- UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) n° 552, de 22 de junho de 2009. Altera o Regulamento (CE) n° 1.907/06 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo ao registro, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH). **Suíça**, 2009
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Disponível em: <www.epa.gov/risk>. Acesso em: 24 jul 2016
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA, 1994. **The Water Quality Standards Handbook**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/wqs-tech/water-quality-standards-handbook>>
- VACCHI, F. I.; ALBUQUERQUE, A. F.; VENDEMIATTI, J. A.; MORALES, D. A.; ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S.; ZOCCOLO, G. J.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 302-309, 2013
- VAIDYA, A. A.; DATYE, K. V. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. **Colourage**, v. 14, p. 3-10, 1982
- VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D. M.; COFFEY, D. S. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. **Cell**, n. 22, p. 79-85, 1980

WALTON, R. P.; LAWSON, E. H. Pharmacology and toxicology of the azo dye, phenyl-azo-alpha-diaminopyridine (pyridium). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 51, p. 200-216, 1934

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

WORLD DYES & ORGANIC PIGMENTS. Disponível em: <
<http://www.prnewswire.com/news-releases/world-dyes--organic-pigments-market-300113681.html>>. Acesso em: 27 out 2015

ZHRIM, A. Y.; TIZAOUI, C.; HILAL, N. Evaluation of several commercial synthetic polymers as flocculant aids for removal of highly concentrated C.I. Acid Black 210 dye. **Journal of Hazard Materials**, v. 182, p. 624-630, 2010

ZANONI, T. B. **Avaliação do perfil de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes Basic Red 51, Basic Yellow 57 e p-fenilenodiamina usados na tintura de cabelo em células da pele**. Ribeirão Preto, 168 p., Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Área de Concentração: Toxicologia, 2014

“O opressor não seria tão forte se não tivesse cúmplices entre os próprios oprimidos.”

Simone de Beauvoir

Apêndices

APÊNDICE A – Resultados de cada experimento do Ensaio do Cometa em células HepG2 para o corante *Acid Black 210*

Acid Black 210 ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Tail Moment		
	1ª Repetição (média \pm desvio-padrão)	2ª Repetição (média \pm desvio-padrão)	3ª Repetição (média \pm desvio-padrão)
Controle Neg.	1,21 \pm 1,07	1,60 \pm 1,18	1,28 \pm 1,24
Controle Posit.	4,45 \pm 3,03	7,15 \pm 3,48	18,16 \pm 10,31
0,5	1,36 \pm 1,16	1,70 \pm 1,39	1,46 \pm 1,19
5	1,43 \pm 1,11	2,12 \pm 1,74	1,56 \pm 1,08
50	1,40 \pm 0,96	2,58 \pm 1,75	1,73 \pm 1,53
500	1,64 \pm 1,53	1,69 \pm 1,37	2,00 \pm 1,71
5.000	2,25 \pm 1,56	2,44 \pm 1,66	2,54 \pm 2,22

	Tail Intensity		
	1ª Repetição (média \pm desvio-padrão)	2ª Repetição (média \pm desvio-padrão)	3ª Repetição (média \pm desvio-padrão)
Controle Neg.	4,01 \pm 3,74	5,56 \pm 4,36	4,05 \pm 4,04
Controle Posit.	13,16 \pm 8,58	19,33 \pm 9,09	40,04 \pm 24,55
0,5	4,48 \pm 3,92	5,86 \pm 4,95	3,93 \pm 3,55
5	4,37 \pm 3,43	7,59 \pm 6,16	4,19 \pm 3,34
50	4,58 \pm 3,33	9,15 \pm 6,25	4,40 \pm 4,16
500	4,96 \pm 4,66	6,05 \pm 5,04	5,03 \pm 4,68
5.000	7,24 \pm 5,37	8,79 \pm 6,57	2,00 \pm 1,71

APÊNDICE B – Resultados de cada experimento do Ensaio do Cometa em células HaCaT para o corante *Disperse Violet 93*

<i>Disperse Violet 93</i> (µg / mL)	<i>Tail Moment</i>		
	1ª Repetição (média ± desvio-padrão)	2ª Repetição (média ± desvio-padrão)	3ª Repetição (média ± desvio-padrão)
Controle Neg.	1,12 ± 0,88	0,81 ± 0,71	0,95 ± 0,65
Controle Posit.	18,88 ± 6,02	14,23 ± 4,21	9,61 ± 3,68
5	7,80 ± 4,48	1,69 ± 1,43	4,66 ± 2,94
10	3,39 ± 2,17	1,56 ± 1,55	6,29 ± 4,48
50	4,49 ± 8,99	1,89 ± 1,87	4,54 ± 2,84
100	4,03 ± 2,96	1,03 ± 0,89	6,20 ± 3,28
600	4,04 ± 2,29	1,39 ± 1,17	6,10 ± 3,60

	<i>Tail Intensity</i>		
	1ª Repetição (média ± desvio-padrão)	2ª Repetição (média ± desvio-padrão)	3ª Repetição (média ± desvio-padrão)
Controle Neg.	3,61 ± 3,31	2,45 ± 2,20	3,14 ± 2,53
Controle Posit.	31,20 ± 10,11	22,94 ± 6,50	20,64 ± 6,90
5	17,72 ± 8,88	5,25 ± 4,36	12,83 ± 8,49
10	9,85 ± 6,14	4,52 ± 4,35	16,87 ± 11,43
50	10,21 ± 9,12	5,37 ± 4,87	13,75 ± 8,92
100	10,35 ± 7,19	3,57 ± 3,06	16,99 ± 8,97
600	10,18 ± 6,14	4,11 ± 3,46	16,88 ± 10,29

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

Anexos

ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS




CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do risco ecogenotóxico da utilização de corantes têxteis”, protocolo nº 16.1.157.60.8, sob a responsabilidade de Otávio Pelegrino Rocha e da Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na data de 12/04/2016.

Vigência do Projeto	15/05/2016 a 31/10/2016
Espécie/Linhagem	Peixe <i>Danio rerio</i>
Nº de animais	840
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Indiferente
Origem	Biotério de Toxicologia Ambiental da FCFRP

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2016.


Profa. Dra. Ana Patricia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP

ANEXO B – Artigo relacionado à Tese já aceito para publicação no periódico *Toxicology* (JCR-2015: 3,817)



Ecotoxicological risk assessment of the "Acid Black 210" dye

Otávio Pelegrino Rocha^{a,*}, Cibele Aparecida Cesila^a, Elisa Maria Christovam^b,
Sílvia Berlanga de Moraes Barros^c, Maria Valnice Boldrin Zanoni^b,
Danielle Palma de Oliveira^a

^aLaboratory of Environmental Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP 14040-902, Brazil
^bInstitute of Chemistry, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP 14889-080, Brazil
^cLaboratory of Skin Biology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo-SP 05508-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2015
Received in revised form 11 March 2016
Accepted 13 April 2016
Available online xxx

Keywords:

Acid Black 210
Dye
Ecotoxicological risk assessment

ABSTRACT

The "Acid Black 210" dye is one of the most used black dyes by the leather industry. This compound contains three azo groups in its chemical structure, and has been quoted as a non-regulated dye with toxicological concern, since it could generate carcinogenic aromatic amines. The objective of this study was to perform the ecotoxicological risk assessment of this dye through testing its toxicity *in vitro* and *in vivo* with the Ames test, the Comet assay, the *Daphnia similis* test, and the zebrafish embryo acute toxicity test. Moreover, we evaluated the presence of this dye in environmental samples related with a tannery industry. All the tests performed were negative, with the exception of the Ames test with the *Salmonella typhimurium* TA98 strain, which resulted in a low mutagenic potency. Due to the low concentrations of the "Acid Black 210" dye found in tannery effluents, and the high concentrations where any toxic activity is occasionally described, we concluded that this dye is safe from the ecotoxicological point of view in the areas evaluated and in the light of the current knowledge.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dyes are widely used in textile dyeing, paper printing, color photography, pharmaceutical, food, cosmetic, and other industries (Bafana et al., 2011). The world market of dyes, pigments and intermediates is valued at billions of dollars. Dyes must have a high degree of chemical and photolytic stability to be useful, and consequently, they can be resistant to degradation, and considered persistent bioaccumulative toxic (PBTs) substances.

The acute toxicity of azo dyes, as defined by the European Union criteria for classification of dangerous substances, is rather low. Azo dyes can also cause a variety of chronic effects, and carcinogenicity of many of the azo dyes has been demonstrated experimentally (Bafana et al., 2011). Since dye-containing effluents are normally discharged into water bodies, toxicity of dyes has mainly been studied against aquatic organisms. Azo dyes have

been found to be toxic towards several aquatic organisms including algae, fish, and crustaceans (Bafana et al., 2011).

Acid Black 210 (AB210) is an azo (metal complex) dye containing sulphonyl and amino groups used in cotton, leather and woolen dyeing worldwide (Mohan et al., 2007). During a search for publicly available toxicity data on non-regulated aromatic amines, it was observed that the toxicity database was found to be insufficient or non-existent (Brüschweiler et al., 2014). AB210 was pointed to have the cleavage products 4-nitroaniline, which the Dutch Health Council recommended to classify as suspected human carcinogen (Dutch Health Council, 2008), and 4-aminobenzene sulfonic acid, which may cause sensitization by skin contact (Brüschweiler et al., 2014).

The only available data in the literature about the toxicity of AB210 are microbial toxicity test and comet assay with *Allium cepa* roots employing 1500 mg/L of AB210 (Agrawal et al., 2014). Due to the lack of toxicological data about the AB210, the aim of this work was to evaluate some *in vivo* and *in vitro* ecotoxicological endpoints. Also the presence of AB210 in environmental samples from effluent discharge from a tannery industry was measured. With these results we performed an ecotoxicological risk assessment of the AB210 in the area studied.

* Corresponding author.
E-mail addresses: otavio@fcrp.usp.br, otavio_pelegrino@yahoo.com.br (O.P. Rocha), dpalma@usp.br (D.P. de Oliveira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.04.002>
0167-4835/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: O.P. Rocha, et al., Ecotoxicological risk assessment of the "Acid Black 210" dye, *Toxicology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.04.002>