



AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DE UM AZO CORANTE, UTILIZANDO O TESTE SALMONELLA/MICROSSOMA

Jean Fachini¹

Julia Pereira Unfer²

Cleonice Hoffmann³

Juliana Bondan da Silva⁴

Crislaine Maria Carvalho Da Cruz Brambilla⁵

Jaqueline Nascimento Picada⁶

Resumo:

O corante Amido Black 10B está entre os corantes mais utilizados em todo o mundo em indústrias como têxteis, curtimento e gráficas. Este composto contém na sua estrutura química duas ligações azo que, quando biodegradadas, podem formar aminas aromáticas. Devido à falta de dados toxicológicos sobre o corante azo Amido Black 10B, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade mutagênica do mesmo através do teste Salmonella/Microsoma. Os dados gerados nesta pesquisa indicam que o corante Amido Black 10B apresenta efeitos mutagênicos em linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA97a, que detectam mutações por deslocamento no quadro de leitura, na ausência de metabolização. Este corante pode estar parcialmente relacionado com a toxicidade observada em estudos com animais e com linhagens celulares expostas a efluentes das indústrias gráfica, de couro e têxtil que utilizam corantes azo em seus processos de tingimento. No entanto, são necessários mais estudos sobre os corantes azo, a fim de que se possa estabelecer critérios para a eliminação segura desses xenobióticos.

Palavras chave: Amido Black 10B, corantes azo, mutagenicidade, teste Salmonella/microsoma

INTRODUÇÃO

Os corantes azo são um grupo de corantes amplamente utilizados nos processos de curtimento de couros, tecidos e impressões, sendo considerados os mais importantes na indústria do tingimento, pois aproximadamente 80% dos corantes ácidos e reativos são azo compostos. Esses intensificam a coloração do couro, por exemplo, tornando-o mais atrativo visualmente (RAFII et al., 1997; GUARATINI; ZANONI, 2000). Porém possuem baixa degradabilidade, levando ao descarte de efluente com índices de coloração em desconformidade com a legislação vigente.

O descarte desses compostos em ecossistemas aquáticos dificulta a penetração dos raios solares sobre a água provocando alterações nos ciclos biológicos da biota aquática, afetando processos de fotossíntese, oxigenação de corpos d'água, podendo atingir também reservatórios e estações de tratamento de água acarretando problemas a saúde da população

¹Aluno do Curso de Graduação em Biomedicina – Bolsista CNPq – jeanfachini@hotmail.com

²Aluna do Curso de Graduação em Biomedicina – Voluntária – julia.unfer@hotmail.com

³Aluna do Curso de Graduação em Biomedicina – Bolsista CNPq – cleo2506@hotmail.com

⁴Aluna do Curso de Graduação em Biologia – Bolsista Fapergs – julianabonda@gmail.com

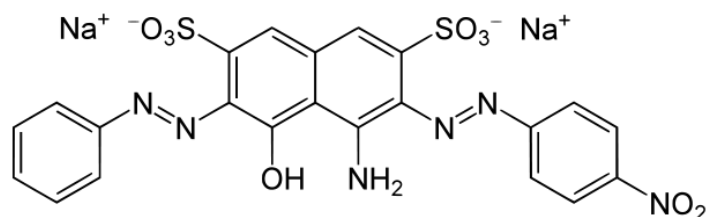
⁵Aluna de Pós-graduação em Biologia Celular – PPGBioSaude – cris289cruz@hotmail.com

⁶Professora Orientadora – jnpicada@gmail.com

(KUNZ et al., 2002; ROBINSON et al., 2002; PEREIRA; FREIRE, 2005). Um estudo feito por Oliveira e colaboradores (2007), mostrou que o efluente tratado de uma indústria de tingimento era mutagênico e continha diversos tipos de corantes. Outro estudo feito com amostras do efluente dessa mesma indústria demonstrou que ratos Wistar expostos a essa amostra apresentaram aumento na incidência de criptas aberrantes no cólon, que é um biomarcador precoce de carcinogenicidade (LIMA et al., 2007). Estudos em trabalhadores expostos demonstraram que ocorre azo-redução desses corantes no homem, gerando aminas aromáticas que podem causar câncer de bexiga (GOLKA, et al., 2004). A exposição humana aos azo compostos ocorre através do consumo de água contaminada ou do contato com a pele. A exposição oral pode levar à formação de aminas aromáticas, tanto por meio da microflora intestinal, como por azoredutases do fígado, sendo que algumas dessas aminas têm apresentado propriedades carcinogênicas (LIN; WU, 1973).

O corante Amido Black 10B (Figura 1) está na lista dos corantes mais utilizados mundialmente. Não existem estudos de mutagenicidade com esse corante, mas existe uma revisão de Chung e Cerniglia (1992) relacionando mutagenicidade e estrutura atividade de outros corantes com estrutura similar ao Amido Black 10B, onde todos que tem essa estrutura similar demonstraram ser mutagênicos. O objetivo deste estudo é avaliar a capacidade deste corante em induzir mutações, utilizando o teste Salmonella/microssoma.

Figura 1. Estrutura química do corante Amido Black 10B.



METODOLOGIA

Teste Salmonella/microssoma

A mutagenicidade foi avaliada utilizando o procedimento de incorporação padrão descrito em Mortelmans e Zeigler (2000). As linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* foram fornecidas por MOLTOX (Molecular Toxicology Inc., USA). Resumidamente, em tubos de ensaio estéreis com quantidades distintas de Amido Black (250, 500, 1000, 2000 e 5000 µg/placa) foram adicionadas a cultura bacteriana ($1-2 \times 10^9$ células/mL) e 2 mL de gelose (0,6% de agar, 0,5% de NaCl, 50 µM de histidina, 50 µM de biotina, pH 7,4, 42 ° C). Verteu-se o conteúdo dos tubos imediatamente sobre uma placa de ágar mínimo (ágar a 1,5%, meio Vogel-Bonner, contendo 2% de glucose). O controle positivo foi o óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO, 0,5 µg/placa) para TA98, TA97a e TA102 e azida sódica (1 µg/placa) para TA100. Todas as placas foram incubadas no escuro a 37° C durante 48 h antes da contagem de colônias revertentes. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm DP e a significância estatística foi determinada pela Análise de Variância de uma via (ANOVA) complementada pelo teste de Dunnett. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado como indicando significância estatística. Uma substância é considerada mutagênica no teste Salmonella/microsoma quando observada significativa estatística e índice de mutagenicidade (IM) igual ou superior e dois, critério também adotado neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amido Black mostrou atividade mutagênica nas linhagens TA98 e TA97a, que detectam mutações *frameshift* (deslocamento no quadro de leitura). Houve um aumento significativo no número de revertentes na TA100 em concentrações mais altas, no entanto o IM foi inferior a 2, indicando resultado negativo para esta linhagem que detecta mutagenicidade por substituição de pares de bases. Na linhagem TA102 também não foi detectada atividade mutagênica. Muitos estudos têm se voltado para a dificuldade em degradar e remover os corante azo das estações de tratamento de efluentes. Senthilkumar et al. (2011) simularam um efluente contendo o corante Amido Black 10B e observaram que um aumento da concentração de corante no efluente suprimiu a capacidade de descoloração. O resultado positivo para mutagenicidade observado neste estudo reforçam a necessidade de uma melhor avaliação toxicológica deste corante e sua degradação nas estações de tratamento de efluentes.

Tabela 1. Indução de *his*⁺ revertentes em linhagens de *S. typhimurium* com Amido Black 10B (AB) sem ativação metabólica (S9 mix).

Substância	Concentração (µg/placa)	TA98		TA97a		TA100		TA102	
		Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b
Sem ativação metabólica (-S9)									
CN ^c	-	29,0 ± 4,6	-	91,7 ± 10,7	-	134,7 ± 19,4	-	239,0 ± 46,5	-
AB	250	47,3 ± 2,5*	1,63	123,7 ± 30,6	1,35	148,7 ± 21,1	1,10	321,3 ± 46,3	1,34
	500	61,0 ± 4,4***	2,10	126,0 ± 5,6	1,37	154,3 ± 10,7	1,15	252,3 ± 37,5	1,06
	1000	110,7 ± 8,0***	3,82	142,3 ± 8,7*	1,55	143,3 ± 11,2	1,06	308,7 ± 14,3	1,29
	2000	219,7 ± 10,4***	7,58	175,7 ± 16,6***	1,92	173,0 ± 29,1	1,28	260,6 ± 30,4	1,09
	5000	355,3 ± 7,6***	12,25	210,3 ± 13,4***	2,29	227,7 ± 20,6***	1,69	298,7 ± 43,5	1,25
CP ^d	0.5 (4NQO)	215,7 ± 49,5***	7,55	533,3 ± 100,5***	5,82	817,5 ± 17,7***	6,07	1030,0 ± 126,2***	4,31
	1 (NaN ₃)								

^aNumero de revertentes/placa: A média de três experimentos independentes ±DP; ^bIM: índice de mutagenicidade (n° de *his*⁺ induzidas na amostra/ n° de espontâneas do controle negativo); CN: controle negativo: água destilada. CP^d: controle positivo (-S9) azida sódica para TA100: 4-nitroquinolina 1-oxido para TA97a, TA98 e TA102; *p < 0,05; *** p < 0,001, diferença significativa em relação ao controle negativo

CONCLUSÕES

O corante Amido Black 10B é capaz de induzir mutações por deslocamento do quadro de leitura na ausência de metabolização (S9mix). Estudos estão sendo realizados para verificar se o corante apresenta efeito mutagênico na presença de S9mix.

REFERENCIAS

CHUNG, KT; CERNIGLIA, CE. Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. *Mutation Research*, Amsterdam. v. 277, p. 201-220, 1992.

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

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

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

LIN, J. K; WU, Y. H. Studies on the mechanism of methemoglobin formation induced by aminoazo compounds. *Biochemistry Pharmacology*. v. 22, p. 1883-1891, 1973.

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

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

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

SENTHILKUMAR, S; PERUMALSAMY, M; PRAHBU, H. J. Decolourization potential of white-rot fungus *Phanero chaetochry sosporium* on synthetic dye bath effluent containing amido black 10B. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 18, p. 845-853, 2011