SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

RENAN LIMA DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA FORMA HIDROLISADA DO CORANTE REATIVO REMAZOL PRETO B

SÃO PAULO
2012

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

RENAN LIMA DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA FORMA HIDROLISADA DO CORANTE AZO REATIVO REMAZOL PRETO B

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/SES, elaborado no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

Área: Ecotoxicologia genética

Orientadora: Dr[a]. Eliana Nakano

Co-orientador: Dr. Alessandro de Sá Pinheiro

SÃO PAULO
2012

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA FORMA HIDROLISADA DO CORANTE REATIVO REMAZOL PRETO B

RENAN LIMA DE ARAÚJO

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/SES, elaborado no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan

Renan Lima de Araújo

Aprimorando

Dr[a]. Eliana Nakano

Orientadora

Dr[a]. Roxane Maria Fontes Piazza

Surpevisora

“A Deus pertencem a sabedoria e o poder.
Ele muda as épocas e as estações;
destrona reis e os estabelece. Dá sabedoria
aos sábios e conhecimento aos que sabem
discernir. Revela coisas profundas e
ocultas; conhece o que jaz nas trevas e a
luz habita com Ele.”

Daniel 2 : 20-21

AGRADECIMENTOS

À Deus, cuja vontade permitiu a realização deste trabalho.

À Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo, através da Fundação do Desenvolvimento Administrativo, pela oportunidade concedida do curso de aprimoramento profissional e pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Butantan, por toda a infra-estrutura física e acadêmica.

À minha família, pelo incentivo e apoio.

À Dr[a]. Eliana Nakano pelo acolhimento e pela orientação em todo o curso de aprimoramento, desde os fundamentos básicos da pesquisa até o trabalho de conclusão.

Ao Dr. Alessandro de Sá Pinheiro por todo suporte, desde a sugestão do tema do trabalho, passando pelos protocolos de exposição, técnica de eletroforese em gel de célula individual, até formulação e discussão dos resultados.

À Ms[a]. Patrícia Aoki Miyasato pela supervisão nas atividades iniciais de prática laboratorial do aprimoramento.

Ao técnico de microscopia Alexsander Seixas de Souza, pelo suporte no uso da função de fluorescência do microscópio confocal do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

Aos Drs. Ronaldo Zucatelli Mendonça, M[a]. Carolina Elias, Lincoln Suesdek da Rocha e Darci Moraes Barros-Battesti pela prontidão em ajudar com dúvidas e dificuldades em relação às rotinas da pesquisa e pelo compartilhamento de infra-estrutura e materiais.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza pelo direcionamento.

A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia pelo companheirismo e prestatividade.

RESUMO

Em processos de coloração de tecidos na indústria têxtil são despejadas em efluentes de água doce quantidades significantes de corantes residuais, alterando a cor da água e no caso de corantes azo, causando efeitos mutagênicos e carcinogênicos nos organismos habitantes dos corpos d'água receptores. Utilizando modelo de caramujo planorbídeo pulmonado da espécie *Biomphalaria glabrata*, testou-se o potencial genotóxico *in vivo* da forma hidrolisada corante Remazol Preto B, um corante azo-reativo, através do teste do cometa em hemócitos. Foi encontrada genotoxicidade significativa nos grupos expostos as duas maiores concentrações (1 e 2 $g \cdot 10^{-1}$), e concluiu-se que o corante Remazol Preto B apresenta genotoxicidade significativa na forma hidrolisada.

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Modificação estrutural do corante Remazol Preto B 133%: vinilsulfona e hidroxietilsulfona	20
Figura 2	Cromatografia do corante Remazol Preto B 133% (2 g/L); (1) sulfatoetilsulfona; (2) hidroxietilsulfona	21
Figura 3	Dano quantitativo dos cometas de hemócitos de caramujos expostos a diferentes concentrações da forma hidrolisada do corante Remazol Preto B.	27
Tabela 1	Tempo de exposição de cada grupo de caramujos a sua solução e concentração correspondentes	22
Tabela 2	Classes de danos detectados em cometas de hemócito de *B.glabrata* por análise visual. Adaptado de Pinheiro (2011) e Grazeffe *et al.* (2008)	25
Tabela 3	Teste do cometa em caramujos adultos *Biomphalaria glabrata* expostos ao corante Remazol Preto B 133% - hidroxietilsulfona (DD: dano quantitativo; n=6 *n=3)	26

SUMÁRIO

1. Introdução 9

1.1. A genotoxicidade como parâmetro relevante para avaliação do impacto em ambientes aquáticos 9

1.2. A importância da utilização de modelos biológicos para se avaliar a genotoxicidade em ambientes aquáticos 10

1.3. O caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* como um modelo para estudos de genotoxicidade em ambientes aquáticos 11

1.4. O teste do cometa para avaliação de genotoxicidade e sua adequação para hemócitos de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* 13

1.5. A indústria têxtil e a importância da etapa de tingimento de tecidos no impacto do ambiente aquático 15

1.6. Objetivo 18

2. Metodologia 19

2.1. Corante Remazol Preto B 133% 19

2.2. Preparo do corante na forma hidroxietilsulfona 19

2.3. Cromatografia em camada delgada 21

2.4. Exposição 22

2.5. Teste do cometa 23

2.6. Contagem de cometas e estimativa de dano 24

3. Resultados e discussão 26

4. Conclusão 29

5. Bibliografia 30

6. Anexos 34

1. INTRODUÇÃO

1.1. A genotoxicidade como parâmetro relevante para avaliação do impacto em ambientes aquáticos

O DNA é uma estrutura biológica essencial para a manutenção e propagação dos seres vivos no ambiente, pois nele estão contidas as informações necessárias para que cada organismo produza e processe as moléculas essenciais para sua constituição e funcionamento. Entretanto, as informações genéticas contidas no DNA podem ser alteradas de diferentes formas, e tais alterações podem resultar em modificações estruturais das proteínas produzidas bem como dos processos biológicos regulados pela função gênica podendo até levar a morte celular (HOEIJMAKERS, 2009). Em nível sub-letal, as alterações das informações genéticas podem afetar aspectos fisiológicos fundamentais como o metabolismo energético, o potencial adaptativo e o sucesso reprodutivo (JHA, 2008).

As potenciais fontes de alteração estrutural do DNA bem como das informações genéticas nele contidas podem tanto estar dentro do próprio organismo (fatores endógenos) como vir do ambiente (fatores exógenos). Como fatores endógenos que alteram o DNA pode-se citar erros na sua duplicação e a interação de espécies reativas de oxigênio com bases nucleosídicas, quando estas são provenientes de processos metabólicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; MARNETT; PLASTARAS, 2001). Já os fatores exógenos podem ser tanto natureza física, como a radiação ionizante e ultravioleta, quanto química e suas formas de interação com o DNA e as consequências decorrentes podem ser variadas. A atuação pode ser direta, quando o agente interage diretamente com o DNA, ou indireta, quando seus subprodutos interagem com o DNA após ativação metabólica, e as formas de interação podem

envolver apenas uma das fitas de DNA ou as duas fitas, pode ou não implicar em quebra de fita e as consequências resultantes podem ir desde mutações, que podem ser ou não herdáveis (decorrentes de alterações no DNA de células germinativas potencialmente relacionadas a efeitos teratogênicos), carcinogênese (proliferação celular descontrolada decorrente de alterações em oncogenes e genes supressores de tumor) até morte celular (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; GIELAZYN et al., 2003).

Em se tratando de agentes químicos exógenos, é especialmente relevante destacar aqueles encontrados nos ambientes aquáticos, uma vez que o ambiente aquático é o receptor final do número cada vez maior de contaminantes antropogênicos, boa parte dos quais são substâncias potencialmente genotóxicas e carcinogênicas (JHA, 2004). Nakano *et al.* (2003) e Jha *et al.* (2004) enumeram dois efeitos importantes decorrentes do lançamento de substâncias geradas por atividades industriais, de agricultura e domésticas no meio ambiente: o efeito de tais substâncias sobre o ecossistema, podendo resultar em perda de diversidade genética total, e o risco para a saúde humana, via cadeia alimentar. Especificamente entre os efeitos sobre populações naturais, os efeitos que resultam em mutações, principalmente as que interferem na reprodução, merecem atenção especial uma vez que podem ser perpetuados geneticamente (NAKANO, 2003).

1.2. A importância da utilização de modelos biológicos para se avaliar a genotoxicidade em ambientes aquáticos

Para se avaliar os riscos de contaminação genotóxica no ambiente aquático, não é suficiente que apenas se detecte e quantifique agentes genotóxicos utilizando testes químicos específicos, visto que as genotoxinas encontradas no ambiente podem ser misturas complexas e seu potencial genotóxico pode estar relacionado a interações

entre seus componentes. Nesse contexto, o estudo de efeito em modelos biológicos como alvos dos agentes estudados se mostra peculiarmente interessante, uma vez que pode fornecer informações não obteníveis por ensaios químicos (JHA, 2008).

A utilização de modelos biológicos para se estudar agentes genotóxicos se torna ainda mais relevante quando se constata que a ocorrência de tumores malignos em organismos aquáticos tem sido relacionada tanto com maior incidência de câncer em populações humanas quanto ao uso de produtos químicos industriais, como herbicidas (JHA et al., 2000). Em relação às demais espécies, o interesse se volta para a influência no potencial adaptativo das populações (desenvolvimento, fertilidade e fecundidade) para se manter a estrutura populacional a longo-prazo em um dado nicho ecológico (JHA, 2008). Assim, modelos biológicos podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico para um gerenciamento ambiental integrado (JHA et al., 2000). Frenzilli (2009) acrescenta ainda que analisar alterações no DNA em organismos aquáticos seria uma forma bastante propícia para se avaliar a contaminação ambiental por compostos genotóxicos já que possibilitaria a detecção de baixas concentrações de contaminantes numa ampla variedade de espécies.

1.3. O caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* como um modelo para estudos de genotoxicidade em ambientes aquáticos

Dentre os organismos aquáticos, os invertebrados representam mais de 90% das espécies e possuem importantes papéis para o funcionamento do ambiente (JHA, 2008). Depois dos artrópodes, o filo Mollusca é o maior dentre os invertebrados e deste filo, 80% das espécies representam os gastrópodes (BARNES; CALOW; OLIVE, 1995). Além da representatividade numérica, os moluscos são bem distribuídos

geograficamente; são especialmente importantes em seu ecossistema possuem mobilidade bastante limitada (quando não sésseis) facilitando a associação dos efeitos à localização dos agentes causadores; representam diversos tipos de modelos reprodutivos; por não possuírem exoesqueleto, possuem íntimo contato com o ambiente via tegumento, além da via digestiva e respiratória; possuem mecanismos limitados de excreção em relação a outros invertebrados sendo esta uma vantagem para se estudar bioacumulação; são bastante sensíveis a agentes químicos (OEHLMANN; SCHULTE-OEHLMANN, 2003).

Moluscos tem sido bastante utilizados em testes de genotoxicidade tanto para a obtenção de novos biomarcadores quanto para biomonitoramento de corpos aquáticos. Em 1998 o teste do cometa foi utilizado em mexilhões (Mytilius edulis) para se detectar dano ao DNA em células da glândula digestiva (MITCHELMORE et al.), das brânquias (WILSON et al.) e hemócitos (STEINERT et al.). Sasaki (1997), utilizando o mesmo teste, avaliou o dano ao DNA de células branquiais de *Tapes japonica* e *Patunopecten yessoensis*. Em ambientes aquáticos de água doce, o mexilhão-zebra (*Dreissena polymorpha*) é bastante utilizado como modelo para estudos de genotoxicidade (MERSCH; BEAUVAIS; NAGEL, 1996; PAVLICA et al., 2001; KLOBUCAR, 2003; JUHEL et al., 2007; BINELLI, 2008; VINCENT-HUBERT; ARINI; GOURLAY-FRANCE, 2011), mas outros modelos também já foram utilizados como os bivalves *Anodontea cygnea* (BARŠIENĖ; LOVEJOY, 2000) e *Corbicula fluminea* (RIGONATO; MANTOVANI; JORDAO, 2010).

Apesar de bem menos utilizados que bivalves, algumas espécies de gastrópodes também tem sido utilizadas em estudos de genotoxicidade. Baršienė *et al* (2000), incluiu duas espécies de gastrópodes (*Lymnaea ovata* e *Bithynia tentaculata*) entre os modelos de moluscos que utilizarampara avaliação de genotoxicidade na região

marítima de um porto na Inglaterra. Pavlica *et al*. (2000), utilizando o teste do micronúcleo em hemócitos do planorbídeo pulmonado *Planorbarius corneus* expostos *in vivo* a pentaclorofenol, concluíram que o caramujo se mostrou um modelo adequado para o teste realizado. Nakano (2003) estabeleceu o teste do letal dominante também em caramujos planorbídeos pulmonados, mas estes da espécie *Biomphalaria glabrata*, utilizando o albinismo como marcador genético, já que esses são hermafroditas. Os animais foram expostos a diferentes tipos de agentes mutagênicos: fisico de ação direta (radiação ionizante), químico de ação direta (mitomicina C) e químico de ação dependente de ativação metabólica (ciclofosfamida).

1.4. O teste do cometa para avaliação de genotoxicidade e sua adequação para hemócitos de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*

Apesar de muito discutido metodologicamente (COLLINS et al., 1997; COLLINS et al., 2008), o teste do cometa é um dos principais testes de genotoxicidade utilizados atualmente. Tecnicamente denominado teste de eletroforese em gel de célula individual, é um método rápido, visual e quantitativo que, como muito bem observado por Kumaravel *et al* (2009), combina a praticidade das técnicas bioquímicas para detecção de quebras de fitas de DNA e sítios álcali-lábeis com a abordagem individual celular, típicos dos ensaios citogenéticos.

O teste se baseia na capacidade de alças ou fragmentos de DNA carregados negativamente serem arrastados através de um gel de agarose em resposta a um campo elétrico. A quantidade de DNA arrastado depende diretamente do dano provocado ao DNA (FAIRBAIRN; OLIVE; ONEILL, 1995; BURLINSON et al., 2007; KUMARAVEL et al., 2009). A imagem de um nucleóide celular contendo DNA

arrastado incluso em agarose, quando observado em microscopia de fluorescência, se assemelha à imagem de um cometa. A partir dessa analogia, a região onde se concentra o DNA não arrastado seria a cabeça do cometa e o rastro de DNA arrastado difuso, a cauda (VALVERDE; ROJAS, 2009).

Alguns aspectos interessantes do teste, segundo Tice *et al* (2000), Frenzilli *et al* (2009) e Lee *et al* (2003), além da possibilidade de se poder avaliar o dano ao DNA individualmente em cada célula analisada, seriam a sensibilidade para detecção de baixos níveis de dano ao DNA, a necessidade de poucas células para ser executado, a possibilidade de se avaliar o dano resultante da exposição de forma imediata e a possibilidade da utilização de virtualmente qualquer célula eucariótica.

Inicialmente, suspende-se uma população de células em agarose de baixo ponto de fusão e as células, imersas em agarose, são dispostas em lâminas previamente recobertas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal. A seguir, as lâminas são incubadas em uma solução composta de sais e detergentes para que as membranas sejam lisadas e seus nucleóides expostos ainda individualmente isolados. Em seguida, se incuba as lâminas em solução alcalina para que as proteínas associadas ao nucleóide sejam removidas e as alças e fragmentos responsáveis pela expressão do dano, liberados. Na mesma solução, é feita à seguir eletroforese para que as alças e os fragmentos migrem através do gel. Por último, é feita a neutralização para que a alcalinidade não prejudique o contraste da coloração fluorescente que é feita à seguir, para visualização dos cometas (TICE et al., 2000).

O dano ao DNA pode ser quantificado por diferentes parâmetros baseados nos padrões de migração dos fragmentos que formam a cauda, a partir da chamada cabeça, onde normalmente está a concentração inicial maior de DNA do nucleóide antes da eletroforese (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

Os primeiros a quantificar dano no DNA a partir de nucleóides individuais submetidos a eletroforese foram Östlin e Johanson (1984) a partir de células de mamíferos irradiadas. Contudo, pH neutro adotado não possibilitava a denaturação e desenovelamento do DNA, restringindo o teste, essencialmente, à detecção de quebras de fita dupla.

No entanto, Singh (1988), avaliando a quebra de DNA induzido por radiação e peróxido de hidrogênio em linfócitos humanos, adotou em seu trabalho uma versão do teste utilizando pH alcalino na solução de eletroforese, e concluiu que tal ajuste metodológico aumentou a sensibilidade do teste, já que também teria detectado danos decorrentes de quebra de fita simples e sítios álcali-lábeis.

Utilizando hemócitos de caramujos da espécie Biomphalaria glabrata, Grazeffe *et al* (2008) estabeleceram com sucesso o teste do cometa induzindo dano ao DNA de hemócitos utilizando diferentes doses de radiação gama.

1.5. A indústria têxtil e a importância da etapa de tingimento de tecidos no impacto do ambiente aquático

Diversos segmentos de atividade industrial produzem rejeitos que são lançados em efluentes que, por sua vez, podem se unir às mais diversas variedades de corpos d’água, como córregos, rios, lagos, lagoas e os próprios mares e oceanos e, quando não tratados e dispostos inadequadamente, podem representar um perigo tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (HOUK, 1992).

Na indústria têxtil, o processo de tingimento com corantes solúveis sintéticos pode gerar efluentes com concentrações significativas de corante uma vez que parte do corante aplicado ao tecido não se liga a ele sendo então descartado. (HAO; KIM; CHIANG, 2000). A contaminação de corpos d’água por esses compostos provocam,

além da poluição visual, alterações em ciclos biológicos afetando principalmente o processo de fotossíntese e os níveis de oxigênio na água. Além disso, tem-se demonstrado que algumas classes de corantes podem ser carcinogênicas e/ou mutagênicas (SESHADRI; BISHOP; AGHA, 1994; KUNZ et al., 2002; SARATALE et al., 2011).

Os corantes podem ser classificados molecularmente tanto pelo grupo químico que lhe confere cor (grupo cromóforo, ou seja, que absorve luz visível) quanto pelo grupo responsável pela sua fixação ao tecido (GUARATINI; ZANONI, 2000; KUNZ et al., 2002).

Em relação aos grupos cromóforos, os corantes azo são os mais utilizados na indústria têxtil devido a facilidade e baixo custo de sua síntese e sua estabilidade (SARATALE et al., 2011). Caracterizam-se pela presença de um ou mais grupos azo (-N=N-) ligados a sistemas aromáticos em sua estrutura molecular (KUNZ et al., 2002; BEN MANSOUR et al., 2007; SARATALE et al., 2011). A metabolização de corantes azo por microorganismos anaeróbicos tem sido sugerida como uma forma eficiente de descolorimento de efluentes uma vez que, em condições anaeróbicas, existem bactérias que podem catalisar a quebra redutiva das ligações azo pela ação da azoredutase utilizando uma coenzima redutiva como doadora de elétrons mas ao mesmo tempo, os produtos da metabolização, como as aminas aromáticas, podem apresentar atividade mutagênica e carcinogêncica (BEN MANSOUR et al., 2007).

Em relação aos grupos responsáveis pela ligação do corante à fibra do tecido, os corantes reativos, sendo solúveis e aniônicos, são caracterizados principalmente por se ligarem covalentemente à fibra celulósica, proporcionando boas características de tingimento, solidez e estabilidade química (GUARATINI; ZANONI, 2000; KUNZ et al., 2002).

No processo de tingimento, os corantes reativos são modificados da sua forma industrial para sua forma reativa, no intuito de adquirirem maior reatividade com a fibra do tecido para se obter um grau eficiente de fixação. A modificação é feita pela alteração de pH e de temperatura do corante. Durante o processo, a reação pode sofrer hidrólise e originar também uma terceira forma, que não se liga à fibra do tecido, sendo o residual de corantes nessa forma descartado. Mesmo ao passar pelo sistema convencional de tratamento, a maior parte do volume de corante reativo residual permanece inerte e é lançado no efluente (HAO; KIM; CHIANG, 2000).

Assim, os corantes azo-reativos teoricamente poderiam possuir tanto o potencial mutagênico e carcinogênico dos corantes azo e o potencial poluidor dos corantes reativos quando na forma hidrolisada, sendo então importante avaliar o potencial genotóxico dos corantes azo reativos em suas diferentes formas.

Pinheiro (2011) analisou a toxicidade nas formas sulfatoetilsulfona, vinilsulfona e hidroxietilsulfona e a genotoxicidade na forma sulfatoetilsulfona do corante azo-reativo remazol preto B e encontrou maior toxicidade nas formas vinilsulfona e sulfatoetilsulfona em relação a forma hidroxietilsulfona. Não encontrou genotoxicidade significativa na forma sulfatoetilsulfona. Também utilizou o caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* como modelo de exposição *in vivo* bem como o teste do cometa em hemócitos para avaliar a genotoxicidade.

1.6. Objetivo

O objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial genotóxico *in vivo* do corante azo reativo Remazol preto B na forma hidrolisada através do teste do cometa em hemócitos de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.

2. METODOLOGIA

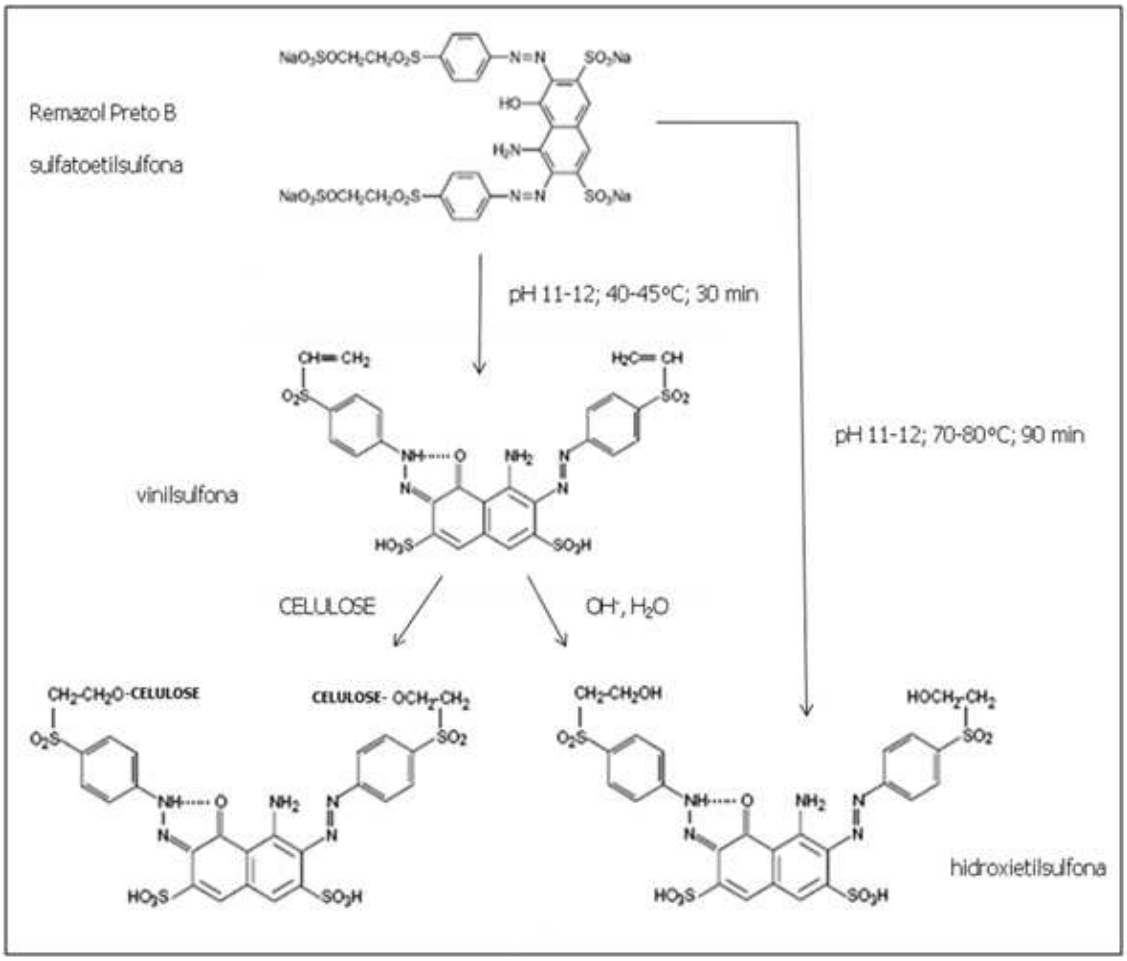
2.1. Corante Remazol Preto B 133%

O corante Remazol Preto B 133% (C.I. Reactive Black 5) foi cedido pela *DyStar* do Brasil na forma sulfatoetilsulfona.

2.2. Preparo do corante na forma hidroxietilsulfona

A partir da solução concentrada do corante, o pH foi ajustado para 11-12 adicionando-se NaOH 40%. A solução foi aquecida a 70-80° C por 90 minutos e, em seguida, a reação foi interrompida ajustando-se o pH para 4,5-5,0 com HCl 31%. A modificação do RPB para hidroxietilsulfona está representada na Figura 1.

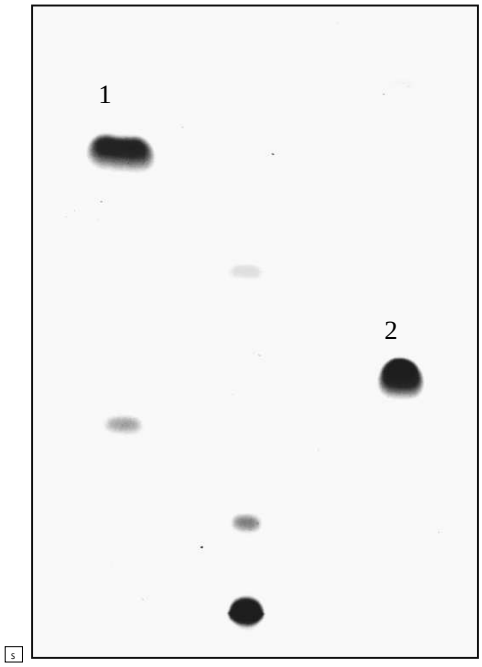
Figura 1. Modificação estrutural do corante Remazol Preto B 133%: vinilsulfona e hidroxietilsulfona (PINHEIRO, 2011)



2.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após modificação estrutural dos corantes foi realizada cromatografia em camada delgada para confirmação do processo de modificação. A placa cromatográfica de alumínio revestida com RP18 F 254 (Merck) foi utilizada como fase estacionária e solução de metanol (45%), solução tampão pH 7 Titrisol Merck (20%) e NaCl 5% (35%) como fase móvel. Para análise, 5 µL dos corantes (2 g L-1) foram aplicados na placa. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de aproximadamente 80 minutos.

Figura 2. Cromatografia do corante Remazol Preto B 133% (2 g/L); (1) sulfatoetilsulfona; (2) hidroxietilsulfona.



2.4. Exposição

30 caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* mantidos em laboratório, com idade entre 2 e 6 meses, em água filtrada e aerada, alimentados diariamente com alface, foram divididos em 5 grupos. A exposição de cada grupo se deu em copos de vidro com capacidade volumétrica aproximada de 200 mL. A água utilizada nos grupos controle e na preparação das diferentes concentrações de corante foi filtrada em filtro de partícula e sistema de carvão ativado. Todas as soluções da exposição foram trocadas a cada 48h.

Tabela 1. Tempo de exposição de cada grupo de caramujos a sua solução e concentração correspondentes.

Grupo e concentração	**Tempo de exposição**
Controle negativo (água filtrada)	7 dias
Corante hidrolisado 0,5 $g \cdot L^{-1}$	
Corante hidrolisado 1 $g \cdot L^{-1}$	
Corante hidrolisado 2 $g \cdot L^{-1}$	
Controle positivo (etilmetanosulfonato 50 $mg \cdot L^{-1}$)	72 h

2.5. Teste do cometa

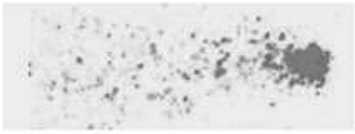
A técnica de eletroforese em gel de células individuais foi realizada a partir da metodologia de Grazeffe *et al* (2008) de acordo com Singh (1988). Cada animal foi submetido à estimulação pedal mecânico para coleta de 100 µL de hemolinfa. A viabilidade dos hemócitos presentes na hemolinfa foi verificada pelo teste de exclusão do Trypan Blue (TENNANT, 1964) e foi adotada como aceitável a viabilidade celular de 70-80 %. Em seguida, a hemolinfa foi diluída em 500 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% diluído em PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} a 37° C. A suspensão foi disposta sobre duas lâminas pré-recobertas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% (diluída em PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} e solidificada overnight). Cada lâmina foi recoberta com lamínula (26 x 76 mm) e submetidas à temperatura de 4° C por aproximadamente 5 min até solidificação da suspensão de hemolinfa em agarose. As lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% sarcosinato de sódio, 1% Triton X-100, 10% DMSO pH 10.0) por 2 horas, a 4° C, protegidas da luz. Em seguida, as lâminas foram posicionadas lado a lado em uma cuba de eletroforese (25 cm x 55 cm) e imersas em tampão alcalino (1 mM EDTA, 300 mM NaOH) por 30 minutos e em seguida submetidas à eletroforese (0,74 V/cm, 150 mA) por 30 minutos a 4° C. Ao fim, cada lâmina foi neutralizada sendo imersa em Tris 0,4 M por três exposições de 5 minutos, sendo a solução trocada entre cada exposição, e fixadas em etanol absoluto por 10 minutos. Por ocasião da leitura, cada lâmina foi reidratada em água destilada por 10 minutos e então, corada com solução de brometo de etídio na concentração de 20 µg/mL. Os cometas foram analisados em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss) em

aumento de 400 x, com filtro de excitação de 515 - 560 nm e filtro de barreira de 590 nm. As lâminas foram analisadas em teste cego.

2.6. Contagem de cometas e estimativa de dano

Foram contadas 200 células por animal (100 células por lâmina) e estas foram classificadas visualmente em classes de 0 a 3 de acordo com a extensão de DNA migrado. A classificação visual teve como parâmetros a aparência dos cometas, incluindo comprimento da cauda, diâmetro e intensidade de fluorescência da cabeça da seguinte forma: cometas com cabeças luminosas e sem cauda aparente serão classificados como classe 0; cometas com cabeças bem pequenas e caudas longas e difusas, como classe 3; cometas apresentando características intermediárias entre as categorias 0 e 3 foram previamente padronizados para facilmente serem distinguíveis como categorias 1 e 2 (Tabela 2). Cometas com cabeça demasiado pequena ou não existente e cauda extensa e difusa não foram incluídos na análise (GRAZEFFE et al., 2008).

Tabela 2. Classes de danos detectados em cometas de hemócito de *B.glabrata* por análise visual. Adaptado de Pinheiro (2011) e Grazeffe *et al.* (2008).

Classe	Critérios de classificação	Aparência
0	Células sem dano: cometas com cabeça grande e sem cauda, sem migração do DNA.	
1	Células pouco danificadas: cometas com cauda bem curta, com pouca migração do DNA	
2	Células danificadas: cometas com caudas longas, com migração intermediária de DNA.	
3	Células muito danificadas: cometas com cabeças bem pequenas e uma cauda muito longa, com muita migração de DNA.	

Para a análise quantitativa do dano foi utilizada a fórmula descrita por Jaloszynski *et al.* (1997):

$$DD = \frac{1n_1 + 2n_2 + 3n_3}{\sum/100}$$

Onde ‘DD’ é o dano quantitativo, ‘n’ corresponde o número de cometas por classe de 0 a 3, a soma de ‘$1n_1 + 2n_2 + 3n_3$’ corresponde ao SCORE e ‘Σ’, a soma de todos os cometas contados. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do Método de Tukey (PINHEIRO, 2011).

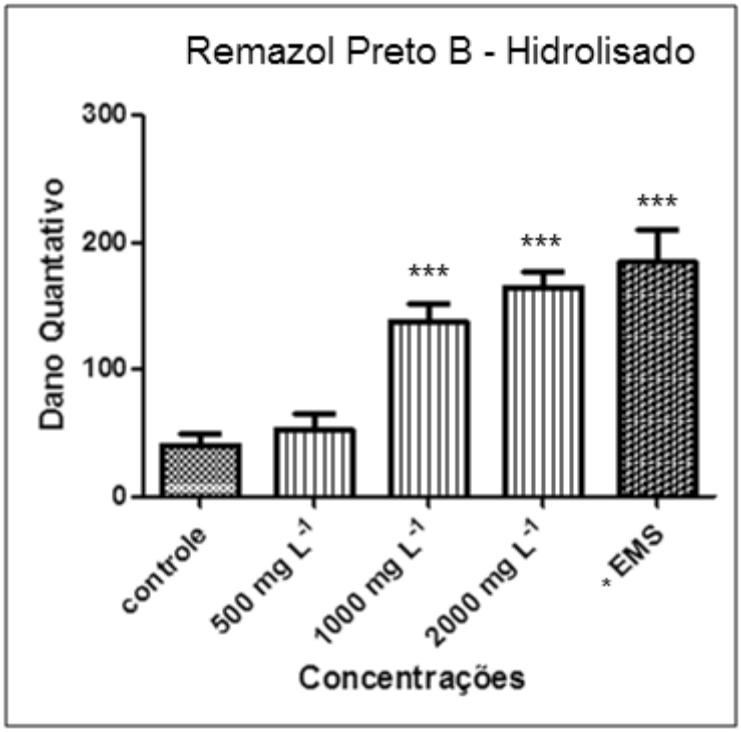
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada amostra utilizada no teste apresentou população de hemócitos com viabilidade > 75%. Apenas lâminas de 3 animais estiveram em condições de leitura no grupo exposto a etilmetanosulfonato (controle positivo). Os resultados da análise visual do teste do cometa em hémocitos de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* estão expressos respectivamente na Tabela 3 e Figura 3.

Tabela 3. Teste do cometa em caramujos adultos *Biomphalaria glabrata* expostos ao corante Remazol Preto B 133% - hidroxietilsulfona (DD: dano quantitativo; n=6 *n=3)

Concentração	Nº de	Categoria de dano no DNA (%)				DD
(mg L^{-1})	células	0	1	2	3	
0	1000	774 (77,4)	128 (12,7)	41 (4,1)	57 (5,7)	38
500	1100	760 (69,1)	172 (15,6)	92 (8,4)	76 (6,9)	53
1000	1100	338 (30,7)	292 (26,5)	236 (21,4)	249 (22,6)	137
2000	1041	219 (21,0)	263(25,3)	231 (22,2)	328(31,5)	164
*EMS (50)	600	31 (5,2)	211 (35,1)	181 (30,2)	177 (29,5)	184

Figura 3. Dano quantitativo dos cometas de hemócitos de caramujos expostos a diferentes concentrações da forma hidrolisada do corante Remazol Preto B. *50 mg · L^{-1} *** p < 0,001 em relação ao controle.



As duas maiores concentrações do corante testadas (1 e 2 g · L^{-1}) apresentaram genotoxicidade significativamente maior em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), o que não ocorreu com o grupo exposto ao corante na concentração 500 mg · L^{-1}. Ao mesmo tempo, não houve diferença significativa na genotoxicidade entre grupos expostos a 1000 e 2000 mg · L^{-1}.

Pinheiro (2011) realizou o teste do cometa em hemócitos de caramujos da espécie de *Biomphalaria glabrata* expostos ao corante Remazol Preto B na forma sulfatoetilsulfona (forma industrial) e não encontrou diferença significativa entre os grupos expostos a diferentes concentrações do corante em relação ao controle.

Gottlieb (2003) verificou fraca genotoxicidade do corante Preto Reativo 5 na forma hidrolisada em teste de impedância elétrica em bactérias com sistema de reparo deficiente e não encontrou genotoxicidade na forma não hidrolisada.

Uma maior genotoxicidade do corante na forma hidrolisada, poderia corroborar com a afirmação de Novotný (2006) de que a presença de grupos sulfônicos na molécula pode diminuir sua mutagenicidade, já que a forma sulfatoetilsulfona possui mais grupos sulfônicos que a forma hidroxietilsulfona.

Não se pode deixar de pontuar que o corante utilizado foi modificado a partir da sua forma industrial, inclusos os aditivos (em sua essência, detergentes e sais) utilizados para otimização dos processos industriais de tingimento. Dessa forma, não se pode atribuir os efeitos observados apenas ao corante em sua forma molecular. Ao mesmo tempo, o corante testado teoricamente possui composição que representaria aqueles utilizados na indústria, logo seus efeitos poderiam ser representativos em relação aos que ocorreriam no ambiente.

Testes direcionados são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais ocorre a genotoxicidade observada.

4. CONCLUSÃO

Dado o objetivo do presente trabalho, conclui-se que a forma hidrolisada do corante Remazol Preto B apresenta genotoxicidade significativa para caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* expostos *in vivo*.

5. BIBLIOGRAFIA

BARNES, K.; CALOW, P.; OLIVE, J. Os invertebrados: uma nova síntese. São Paulo: Atheneu. 1995. 526 p.

BARŠIENĖ, J.; LOVEJOY, D. B. Environmental Genotoxicity in Klaipėda Port Area. International Review of Hydrobiology, v.85, n.5-6, p.663-672. 2000.

BEN MANSOUR, H. et al. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by Pseudomonas putida mt-2. Food and Chemical Toxicology, v.45, n.9, p.1670-1677. 2007.

BINELLI, A. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp′-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (Dreissena polymorpha). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v.649, n.1-2, p.135-145. 2008.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. Mutation Research, v.627, n.1, p.31-5. 2007.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: What can it really tell us? Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v.375, n.2, Apr 29, p.183-193. 1997.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. Mutagenesis, v.23, n.3, p.143-51. 2008.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, v.339, n.1, p.37-59. 1995.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; ONEILL, K. L. The comet assay - A comprehensive review. Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology, v.339, n.1, p.37-59. 1995.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, v.681, n.1, Jan-Feb, p.80-92. 2009.

GIELAZYN, M. L. et al. Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v.542, n.1-2, Dec 9, p.15-22. 2003.

GOTTLIEB, A. et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. Journal of Biotechnology, v.101, n.1, Feb 27, p.49-56. 2003.

GRAZEFFE, V. et al. Establishment of the comet assay in the freshwater snail Biomphalaria glabrata (Say, 1818). Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v.654, n.1, p.58-63. 2008.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. Química Nova, v.23, p.71-78. 2000.

HAO, O. J.; KIM, H.; CHIANG, P.-C. Decolorization of Wastewater. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v.30, n.4, 2000/10/01, p.449-505. 2000.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. New England Journal of Medicine, v.361, n.15, p.1475-1485. 2009.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutation Research, v.277, n.2, Aug, p.91-138. 1992.

JALOSZYNSKI, P. et al. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. Mutation Research-DNA Repair, v.385, n.3, Dec, p.223-233. 1997.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. Mutation Research, v.552, n.1-2, p.1-17. 2004.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. Mutagenesis, v.23, n.3, p.207-221. 2008.

JHA, A. N. et al. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, Mytilus edulis. Mutation Research, v.464, n.2, p.213-28. 2000.

JUHEL, G. et al. In vivo exposure to microcystins induces DNA damage in the haemocytes of the zebra mussel, Dreissena polymorpha, as measured with the comet assay. Environmental and Molecular Mutagenesis, v.48, n.1, Jan, p.22-29. 2007.

KLOBUCAR, G. Application of the micronucleus and comet assays to mussel Dreissena polymorpha haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. Aquatic Toxicology, v.64, n.1, p.15-23. 2003.

KUMARAVEL, T. S. et al. Comet Assay measurements: a perspective. Cell Biology and Toxicology, v.25, n.1, p.53-64. 2009.

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

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, v.544, n.1, p.43-64. 2003.

MARNETT, L. J.; PLASTARAS, J. P. Endogenous DNA damage and mutation. Trends in Genetics, v.17, n.4, p.214-21. 2001.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M. N.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, Dreissena polymorpha, exposed to clastogens. Mutation Research-Genetic Toxicology, v.371, n.1-2, Nov 4, p.47-55. 1996.

MITCHELMORE, C. L. et al. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (Mytilus edulis L.) digestive gland cells using the "comet" assay. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.41, n.1, Sep, p.51-58. 1998.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutation Research, v.399, n.2, p.135-47. 1998.

NAKANO, E. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk Biomphalaria glabrata (Say, 1818). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v.536, n.1-2, p.145-154. 2003.

NOVOTNY, C. et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. Chemosphere, v.63, n.9, Jun, p.1436-42. 2006.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Molluscs as bioindicators. In: B. Markert, A. Breure, *et al* (Ed.). Bioindicators and Biomonitors. Oxford: Elsevier, v.Volume 6, 2003. Molluscs as bioindicators, p.577-635. (Trace metals and other contaminants in the environment)

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. In: (Ed.). Biochem Biophys Res Commun. United States, v.123, 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, p.291-8

PAVLICA, M. et al. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. Mutation Research, v.465, n.1-2, Feb 16, p.145-50. 2000.

PAVLICA, M. et al. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v.490, n.2, Feb 20, p.209-214. 2001.

PINHEIRO, A. Avaliação da toxicidade e genotoxicidade dos corantes azo reativos Remazol Preto B e Remazol Alaranjado 3R e da eficácia da radiação com feixe de elétrons na redução da cor e efeitos tóxicos Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDAO, B. Q. Detection of Genotoxicity of Water from an Urbanized Stream, in Corbicula fluminea (Mollusca) (In Vivo) and CHO-K1 Cells (In Vitro) Using Comet Assay. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v.59, n.1, Jul, p.31-38. 2010.

SARATALE, R. G. et al. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v.42, n.1, p.138-157. 2011.

SASAKI, Y. F. et al. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. Mutation Research, v.393, n.1-2, Sep 18, p.133-9. 1997.

SESHADRI, S.; BISHOP, P. L.; AGHA, A. M. Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. Waste Management, v.14, n.2, p.127-137. 1994.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, v.175, n.1, p.184-191. 1988.

STEINERT, S. A. et al. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. Mutation Research, v.399, n.1, p.65-85. 1998.

TENNANT, J. R. Evalution of the Trypan Blue technique for determination of cell viability Transplantation, v.2, Nov, p.685-94. 1964.

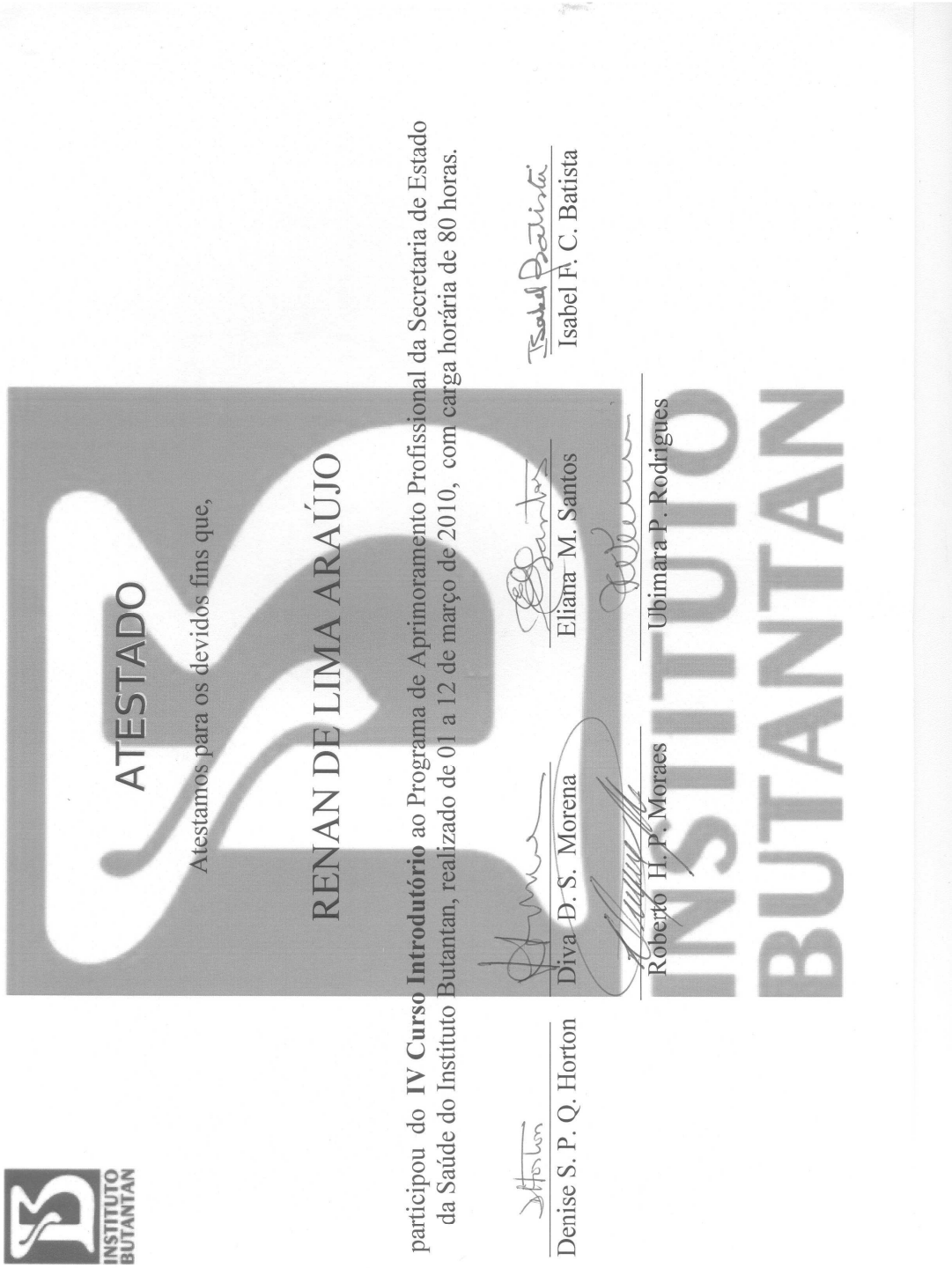
TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen, v.35, n.3, p.206-21. 2000.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v.681, n.1, p.93-109. 2009.

VINCENT-HUBERT, F.; ARINI, A.; GOURLAY-FRANCE, C. Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of Dreissena polymorpha exposed to cadmium, B[a]P and a combination of B[a]P and Cd. Mutation Research, v.723, n.1, p.26-35. 2011.

WILSON, J. T. et al. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, Mytilus edulis L. (Mollusca : Pelecypoda). Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v.399, n.1, p.87-95. 1998.

6. ANEXOS



INSTITUTO BUTANTAN

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins que,

RENAN DE LIMA ARAÚJO

participou do **IV Curso Introdutório** ao Programa de Aprimoramento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde do Instituto Butantan, realizado de 01 a 12 de março de 2010, com carga horária de 80 horas.

Denise S. P. Q. Horton

Diva D. S. Morena

Eliana M. Santos

Isabel F. C. Batista

Roberto H. P. Moraes

Ubimara P. Rodrigues

INSTITUTO BUTANTAN

INSTITUTO BUTANTAN

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins que,

RENAN LIMA DE ARAÚJO

participou do "II Curso de Políticas de Saúde e o SUS" parte do Programa de Aprimoramento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde, realizado nos períodos de 04 a 06/10/10; 25 a 27/10/10 e 16 a 19/11/10, no Instituto Butantan, com carga horária de 40 horas.

Fan Hui Wen | Maria Cristina da C. Marques | Nelson Ibañez

INSTITUTO BUTANTAN

INSTITUTO BUTANTAN

Declaração

Declaramos para os devidos fins, que:

Renan Lima de Araújo

esteve presente no Programa de Atendimento Didático do Instituto Butantan, no dia ***18/03/2010****, no período das* **13:00 às 16:00 horas.**

Tema: Insetos Venenosos

Atenciosamente,

INSTITUTO BUTANTAN DIVISÃO CULTURAL IB

Instituto Butantan

Div. Desenvolvimento Cultural

XIII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan - 2011
"Instituto Butantan 110 Anos: um Olhar para o Futuro"

Certificamos que Renan Lima de Araújo participou da XIII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, de 30 de novembro a 02 de dezembro de 2011, no Instituto Butantan, em São Paulo, SP.

Wilmar Dias da Silva
Presidente da Comissão Organizadora

Ivo Lebrun
Diretor da Divisão de
Desenvolvimento Científico

INSTITUTO BUTANTAN 110 ANOS

RCAB REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL

XII REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL
INSTITUTO BUTANTAN
Biotecnologia e Inovação em Saúde Pública

Certificamos que Renan Lima de Araújo
participou da XII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, de 01 a 03 de dezembro de 2010, no Instituto Butantan, em São Paulo, SP.

Paulo Lee Ho
Presidente da Comissão Organizadora

Solange M. T. Serrano
Presidente da Comissão Organizadora

Ivo Lebrun
Diretor da Divisão de
Desenvolvimento Científico

RCA
REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL

INSTITUTO BUTANTAN

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins que

Renan Lima de Araújo

Freqüentou o Curso de Extensão Universitária

"Mecanismos celulares que modulam sistemas hemostáticos e mecanismos moleculares de indução de distúrbios hemostáticos por toxinas animais "

ministrado neste Instituto, de 13 a 26 de outubro de 2010 ,

com carga horária total de 44 horas/aula.

Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi
Coordenadora do Curso
Lab. Bioquímica & Biofísica

Pan Hui Wen
Diretora
Centro de Desenvolvimento Cultural