

2-FENILBENZOTRIAZÓIS (PBTA): UMA NOVA CLASSE DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Fábio Kummrow*

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000 Alfenas – MG, Brasil

Gisela de Aragão Umbuzeiro

Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345, 05459-900 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 8/2/07; aceito em 22/6/07; publicado na web 19/12/07

2-PHENYLBENZOTRIAZOLES (PBTAs): A NEW CLASS OF ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS. This work is a literature review of PBTAs, the phenylbenzotriazoles generated from the reduction and chlorination of azo dyes. The PBTAs and the non-chlorinated PBTAs were isolated for the first time from river blue rayon organic extracts that showed high mutagenic activity in the Salmonella/microsome genotoxicity assay. To date, 8 PBTAs have been identified and beside their mutagenic activity in bacteria they cause genotoxic effects in fish and mammalian cell cultures. Due to the large number of textile dyeing facilities in Brazil, studies to determine them in the aquatic environment seem to be relevant.

Keywords: 2-phenylbenzotriazole-type mutagens; PBTAs; genotoxic environmental contaminants.

INTRODUÇÃO

Freqüentemente, compostos químicos na forma de misturas complexas são lançados no ambiente e muitos são tóxicos e/ou genotóxicos. Além dos próprios compostos originalmente lançados, uma grande variedade de produtos desconhecidos pode ser gerada no próprio ambiente, por processos bióticos e abióticos¹. Devido a esses fatores, análises químicas realizadas para a determinação apenas dos compostos químicos conhecidos, considerados prioritários, e para os quais se têm metodologias analíticas padronizadas, fornecem informações limitadas sobre o potencial tóxico dessas misturas^{1,2}.

Uma ferramenta desenvolvida para auxiliar a identificação de compostos orgânicos tóxicos e/ou genotóxicos desconhecidos, presentes em misturas complexas ambientais, é o conjunto de procedimentos conhecido como Análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB), “Effect-directed analysis”. Essa estratégia analítica, que combina técnicas de extração e/ou “clean up”, fracionamento de extratos, bioensaios e análises químicas², tem sido utilizada com sucesso na identificação de novas classes de contaminantes ambientais¹. Dentre os contaminantes ou classe de contaminantes identificados com auxílio dessa estratégia estão alguns nitro-HPA como o 3-nitrobenzantrona (3-NBA)³, os produtos de desinfecção das águas gerados durante o processo de cloração, como o 3-cloro-4-(diclorometil)-5-5-hidróxi-2(5H)-furanona (MX)⁴ e, recentemente, os 2-fenilbenzotriazóis (PBTA)⁵.

Os 2-fenilbenzotriazóis (PBTA) são compostos genotóxicos que foram identificados pela primeira vez com auxílio do blue rayon como técnica seletiva de extração/concentração, associado ao teste Salmonella/microsoma nas águas do rio Nishitakase em Kyoto, Japão⁵. Esses compostos são formados a partir de corantes azóicos, utilizados principalmente em unidades de tingimento de produtos têxteis, e podem ser produzidos durante o próprio processo industrial, ou em estações de tratamento de efluentes ou esgotos. As etapas do processo industrial de tingimento, bem como do tratamento

de efluentes resultantes, incluem redução com hidrossulfeto de sódio para descoloração dos corantes remanescentes, levando à formação dos PBTA não-clorados. Estes, no processo de cloração realizado para desinfecção dos efluentes, são convertidos nos PBTA⁶⁻⁸ listados na Tabela 1. Até hoje foram descritos por diferentes autores oito PBTA, os quais estão apresentados na Figura 1.

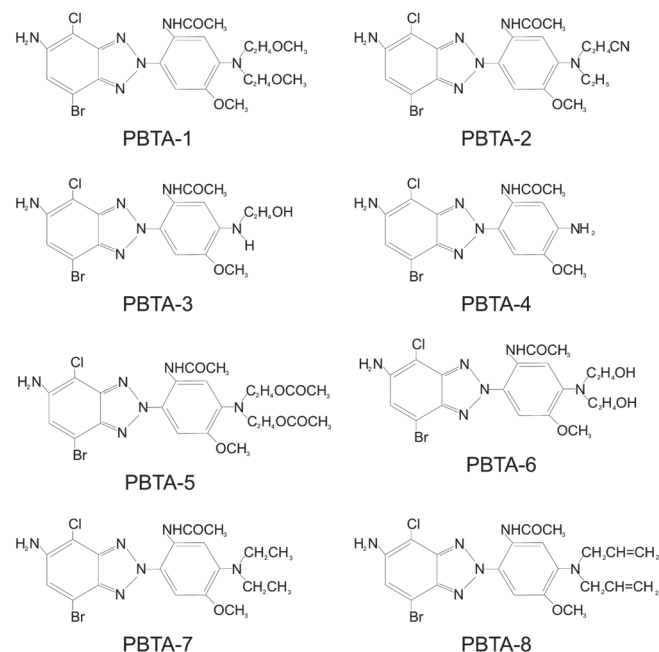


Figura 1. Estruturas químicas dos oito PBTA já identificados

PRESENÇA DOS PBTA NO MEIO AMBIENTE

Os diferentes bioensaios utilizados para avaliação da mutagenicidade de misturas complexas têm demonstrado que as amostras ambientais, como por exemplo as águas superficiais, con-

*e-mail: fabiok@unifal-mg.edu.br

Tabela 1. Nome dos oito PBTA já sintetizados, seus precursores (corantes azóicos) e suas formas não-cloradas (PBTA não-clorado)

PBTA	Corante azóico	PBTA não-clorado	Ref.
PBTA-1 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)-amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxi-5-[bis(2-metoxietil)amino]acetoanilida (Disperse Blue 301)	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)-amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	25
PBTA-2 2-[2-(acetilamino)-4-[N-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-[N-(2-cianoetil)etilamino]-4-metoxiacetanilida	2-[2-(acetilamino)-4-[N-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	15
PBTA-3 2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxietil)-amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxi-5-[(2-hidroxietil)amino]acetanilida	2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxietil)-amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	16
PBTA-4 2-[2-(acetilamino)-4-amino-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	5-amino-2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-amino-4-metoxiacetanilida	2-(2-acetilamino-4-amino-5-metoxifenil)-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	7
PBTA-5 2-[4-[bis(2-acetoxietil)amino]-2-(acetilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	N-[5[bis[2-(acetiloxi)etil]amino]-2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxifenil]acetamida (Disperse Blue 79:1)	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-acetiloxietil)amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	17
PBTA-6 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-hidroxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	N-[5[bis[2-(acetiloxi)etil]amino]-2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxifenil]acetamida (Disperse Blue 79:1)	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-acetiloxietil)amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	17
PBTA-7 2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxi-acetanilida (Disperse Blue 291)	2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	18
PBTA-8 2-[2-(acetilamino)-4-(dialilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2 <i>H</i> -benzotriazol	2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dialilamino)-4-metoxi-acetanilida (Disperse Blue 373)	2-[2-(acetilamino)-4-(dialilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol	18

têm muitos toxicantes ainda não identificados e não regulados que podem ser carcinogênicos e, assim, representar um risco à saúde humana de magnitude desconhecida⁹. A utilização de técnicas seletivas de extração/concentração de amostras, como o blue rayon, associadas a diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* do teste de Salmonella/microsoma podem sugerir as principais classes de contaminantes genotóxicos presentes no ambiente avaliado¹⁰⁻¹².

Nukaya *et al.*¹³ utilizando a técnica de blue cotton e de blue rayon *in situ*¹⁴ e a linhagem de *Salmonella typhimurium* YG1024 verificaram importante atividade mutagênica nos extratos obtidos das águas do rio Nishitakase em Kyoto (Japão), especialmente em pontos de amostragem localizados a jusante de estações de tratamento de efluentes domésticos e industriais. Esses extratos foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com colunas ODS. Cinco compostos foram isolados, representando respectivamente 21, 17, 11, 12 e 6% da atividade mutagênica detectada no extrato total. A partir de um extrato de água obtido de 27 kg de blue cotton, foram isolados 1,1 mg do composto responsável por 21% da atividade mutagênica, através de uma coluna cromatográfica Sephadex LH-20 e CLAE com coluna semi-preparativa ODS. Ainda em 1997, Nukaya *et al.*⁵ determinaram a estrutura química com base nos espectros obtidos por UV, de massas e ¹H-NMR, além de

cristalografia por raio-X como sendo o 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol (PBTA-1). Como este composto não apresenta uso industrial conhecido, os autores sugeriram que poderia ser formado a partir de corantes presentes nos efluentes industriais, tratados nas estações de tratamento de esgotos e efluentes localizadas às margens desse rio⁵.

Oguri *et al.*¹⁵ identificaram outro composto, isolado dos extratos obtidos por Nukaya *et al.*¹³, que representava 17% da atividade mutagênica total observada inicialmente. Esse foi identificado e teve a estrutura determinada com o auxílio das mesmas técnicas utilizadas na identificação do PBTA-1, como sendo o 2-[2-(acetilamino)-4-[N-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol, denominado PBTA-2.

No ano seguinte, Ohe *et al.*⁶ investigaram a presença dos PBTA 1 e 2 nas águas dos rios Katsura, Nishitakase, Kamo e Yodo. Amostras de 40 L de água desses rios foram extraídas/concentradas por blue rayon em colunas. Os extratos foram fracionados por CLAE utilizando coluna semi-preparativa TKS-GEL ODS-120A e, posteriormente, purificados em uma coluna de fase reversa CAPCELL PAK C₁₈. As frações purificadas foram analisadas por CLAE em uma coluna analítica YMC-Pack ODS-A e detector de arranjo de

diodos. Os PBTA 1 e 2 foram encontrados nas amostras dos rios Katsura e Nishitakase. No rio Yodo, somente o PBTA-2 foi encontrado. No rio Kamo, nenhum dos compostos foi detectado. A recuperação dos PBTA 1 e 2 foi avaliada através da adição de quantidades iguais desses compostos (5 ng/L de cada) às amostras fortificadas, e as recuperações obtidas foram 52 e 56%, respectivamente. Os limites de detecção para esses dois compostos foram de 0,01 ng/L.

Um novo composto da classe dos PBTA, o 2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxietyl)-amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-3), foi identificado por Shiozawa *et al.*¹⁶ entre os compostos mutagênicos presentes nos extratos das águas do rio Nikko em Aichi (Japão), em pontos de coleta situados a jusante de estações de tratamento de efluentes. Neste mesmo trabalho, a presença do PBTA-3 foi observada em outros três rios, situados em áreas onde estão localizadas indústrias têxteis. As concentrações de PBTA-3 presentes nas águas dos rios Nikko, Asuwa, Katsura e Nishitakase foram 140, 38, 35 e 22 ng/g de blue rayon, respectivamente.

Ainda como continuação do trabalho de Nukaya *et al.*¹³, foi identificado o composto responsável por 12% da atividade mutagênica verificada no extrato total como sendo o 2-[2-(acetilamino)-4-amino-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-4)⁷. A presença desse PBTA foi verificada também em outros dois rios (Nikko e Uji). As concentrações observadas nos rios Nishitakase, Nikko e Uji, foram 32, 21 e 33 ng/g de blue rayon respectivamente.

Watanabe *et al.*¹⁷ sintetizaram dois novos compostos dessa classe, o 2-[4-[bis(2-acetoxietil)amino]-2-(acetilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-5), a partir do azo corante C.I. Disperse Blue 79:1, e o 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-hidroxietyl)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-6), obtido por meio da hidrólise do PBTA-5 em meio alcalino. Nesse mesmo estudo, águas de cinco rios foram analisadas para determinação desses dois novos PBTA; porém, apenas o PBTA-6 foi encontrado, em concentrações de 112, 80, 21, 3 e 134 ng/g de blue rayon nos rios Asuwa, Tobei, Nishitakase, Katsura e Uji respectivamente.

Um ano mais tarde, Watanabe *et al.*¹⁸ detectaram e quantificaram o 2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-7) e 2-[2-(acetilamino)-4-(dialilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-8) em diversos rios do Japão. O PBTA-7 foi encontrado nos extratos obtidos nos rios Kitsune, Mawatari, Asuwa, Katsura e Uji e o PBTA-8 nos rios Kitsune, Asuwa, Katsura e Uji. No rio Nishitakase ambos PBTA estudados não foram encontrados, embora outros compostos dessa classe tenham sido encontrados nesse rio, conforme anteriormente citado.

Os PBTA 3, 4 e 6 foram encontrados nas águas dos rios Mawatari, Asuwa e Kitsune localizados em Fukui, no Japão, por Watanabe *et al.*¹⁹, utilizando blue rayon *in situ* e CLAE. Esses PBTA foram encontrados em 96% dos 24 extratos analisados e as quantidades encontradas para o PBTA-3 variaram entre < 0,08-58,7 ng/g de blue rayon, para o PBTA-4 entre < 0,1-15,0 ng/g de blue rayon e para o PBTA-6 entre < 0,07-467,9 ng/g de blue rayon.

Com o objetivo de verificar os níveis e o comportamento dos PBTA nos efluentes lançados no rio Uji, Morisawa *et al.*²⁰ desenvolveram um método para a determinação simultânea de seis PBTA (PBTA 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e dois PBTA não-clorados (PBTA não-clorado 1 e 2), baseado na técnica de blue rayon em colunas e determinação por CLAE, utilizando coluna de fase reversa e detector eletroquímico. Os PBTA 2, 3, 4 e 6 foram detectados na maioria das amostras de efluentes, e entre eles, os PBTA 3 e 4 foram os que mais contribuíram para a atividade mutagênica verificada nesses extratos. Nesse estudo as técnicas de blue rayon em colunas e *in situ* foram comparadas, apresentando desempenho similar para recuperação desses compostos²⁰.

Um método para determinação dos PBTA 1 e 2, baseado em extração em fase sólida, com Empore disk C₁₈, e CLAE-espectrometria de massas (EM) “tandem” com ionização por “electrospray”, foi proposto por Moriwaki *et al.*²¹. A porcentagem de recuperação desse método foi avaliada com a adição dos padrões de PBTA nas concentrações 5,0 e 10,0 ng/L de água de rio. Para o PBTA-1 foram observadas porcentagens de recuperação de 87 e 101%, e para o PBTA-2, 106 e 104%, respectivamente. Esse método se mostrou rápido, seletivo e sensível para a determinação de ambos PBTA em águas de rio, presentes na faixa de concentração de ng/L. Utilizando a técnica de extração descrita anteriormente²¹ e CLAE/EM/EM, Moriwaki *et al.*²² desenvolveram um método para a determinação simultânea dos oito PBTA conhecidos. Os limites de detecção para esses compostos em águas de rio variaram entre 0,04 e 0,5 ng/L, e as porcentagens de recuperação variaram entre 65 e 127%. Nas amostras de dois pontos, localizados nos rios Katsura e Nishitakase, os PBTA 2, 3, 4, 6 e 8 foram determinados em concentrações variando entre 0,10 e 17 ng/L. Embora os picos relativos ao PBTA-7 tenham sido observados, suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação e, portanto, não foram calculadas. Nesse trabalho, os PBTA 1 e 5 não foram detectados nas amostras avaliadas. Watanabe *et al.*²³ sugerem que o PBTA-5 não foi encontrado nas amostras analisadas, porque o grupo bis(2-acetoxietil)amino desse PBTA foi hidrolizado a bis(hidroxietyl)amino durante os processos industriais de tingimento ou durante o tratamento dos efluentes industriais.

Recentemente, Ohe *et al.*⁹ avaliaram a mutagenicidade e os níveis de PBTA em efluentes, sedimentos, águas de rios (Yodo, Uji, Katsura, Nishitakase e Kizu) e águas tratadas para abastecimento público. Do total de extratos de blue rayon *in situ* obtidos dos rios avaliados entre os anos de 1996 e 2005, 50% apresentaram mutagenicidade classificada como extrema (> 100.000 revertentes/g equivalente de blue rayon para a linhagem YG1024 do teste de Salmonella / microssoma). As maiores concentrações de PBTA-1 e 2 foram observadas nos efluentes finais das estações de tratamento, que recebem efluentes domésticos e industriais. As amostras de sedimento apresentaram atividade mutagênica com perfil semelhante ao das amostras de efluentes e de águas de rio, porém, apenas traços dos PBTA-2 e 3 foram detectados nessas amostras, indicando a presença de outros compostos genotóxicos. Os autores sugeriram que os PBTA, ao contrário de outros compostos policíclicos, não têm tendência de se acumularem nos sedimentos dos corpos d'água. Nas amostras de água tratada não foi detectada a presença de compostos dessa classe, nem de atividade mutagênica nas condições de teste.

Watanabe *et al.*²⁴ determinaram quatro PBTA não-clorados em extratos mutagênicos do rio Ho em Shizuoka (Japão), utilizando blue rayon *in situ* e fracionamento em coluna cromatográfica Sephadex LH-20 (30 mm x 480 mm) e CLAE. Os compostos identificados foram 2-[2-(acetilamino)-4-[N-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol (PBTA não-clorado-2), 2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxietyl)amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol (PBTA não-clorado-3), 2-(2-acetilamino-4-amino-5-metoxifenil)-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol (PBTA não-clorado-4) e 2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2H-benzotriazol (PBTA não-clorado-7). Anteriormente apenas o PBTA não-clorado-1 havia sido identificado em amostras ambientais²⁵.

Embora as características das estruturas químicas dos PBTA sugiram que sua origem esteja ligada aos corantes utilizados em processos de tingimento, sua formação no ambiente e sua presença nos corpos d'água ainda não estão totalmente esclarecidas. Com o objetivo de entender sua formação, e de produzir quantidades necessárias para a completa avaliação toxicológica desses novos contaminantes, procedimentos para síntese desses compostos foram propostos^{15-17,25}.

SÍNTESE DOS PBTA

Shiozawa *et al.*²⁵ descreveram a síntese do PBTA-1 a partir de um corante azóico, através da sua redução por hidrossulfito de sódio e subsequente cloração por hipoclorito de sódio (Figura 2). Considerando as possíveis rotas sintéticas do PBTA-1, os autores direcionaram seus esforços os vários substituintes presentes na molécula, como bromo, cloro, amino, metoxi, acetilamino e bis(2-metoxietil)amino e no próprio esqueleto 2-fenilbenzotriazol, que é formado por ciclização do [(*o*-nitrofenil)hidrazo]benzeno ou [(*o*-aminofenil)azo]benzeno.

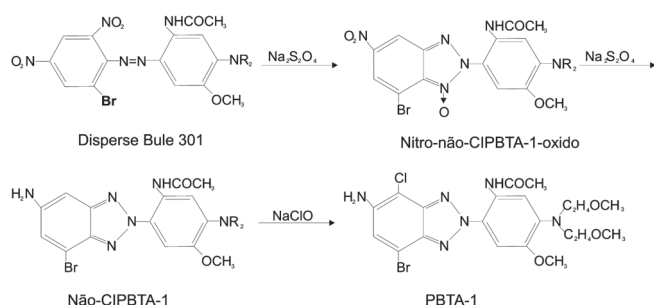


Figura 2. Rota sintética do PBTA-1 proposta por Shiozawa *et al.*³⁰

Seguindo a mesma rota sintética descrita por Shiozawa *et al.*²⁵ variando o azo corante precursor, outros seis PBTA foram sintetizados^{7,15-18}. O objetivo das sínteses foi obter padrões para serem utilizados na determinação desses compostos em amostras ambientais, e obter quantidades suficientes de cada composto para a realização de testes para avaliação de sua toxicidade²⁶. Os azo corantes precursores dos PBTA de 1 a 8 (Tabela 1) apresentam em comum a estrutura 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-4-metoxiacetilanilida como parte das suas moléculas, essencial para sua formação¹⁸.

Basicamente, a formação de todos os PBTA, exceto o PBTA-6, ocorre através da redução do corante azóico precursor (dinitrofenilazo corantes) por ação do hidrossulfito de sódio formando um composto intermediário chamado de PBTA não-clorado e em seguida esse intermediário é clorado pela adição de hipoclorito de sódio (Tabela 1). O PBTA-6 é um produto de hidrólise do PBTA-5 formado sob condições alcalinas²⁶. Na Tabela 2 são apresentadas propriedades físico-químicas dos PBTA.

No Brasil, Oliveira *et al.*²⁷ verificaram a presença de compostos com atividade mutagênica similares aos PBTA em águas para abastecimento público. Nesse caso os compostos foram produzidos em laboratório a partir da adição de ditionito de sódio seguido de cloração com cloro-gás de um produto comercial que continha os corantes C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 e C.I. Disperse Orange 37. A etapa de cloração foi realizada simulando o processo de desinfecção de água que ocorre na Estação de Tratamento de Água (ETA) localizada no Ribeirão dos Cristais, o qual sabidamente continha os corantes citados²⁸. Os compostos gerados no laboratório foram utilizados como padrões para sua identificação nas amostras de água tratada produzida pela referida ETA. Os autores ainda estão identificando as estruturas dos compostos identificados bem como validando as técnicas para a sua quantificação. Os dados obtidos sugerem que os fenilbenzotriazóis detectados nas águas produzidas pela ETA estejam sendo formados no ambiente em duas etapas distintas. A formação dos fenilbenzotriazóis não clorados parece ocorrer na indústria de tingimento, que utiliza agentes redutores para a descoloração dos corantes não ligados às fibras têxteis. Estes, uma vez lançados no ribeirão como constituintes dos efluentes industriais, ao atingirem a ETA reagem com o cloro na etapa conhecida como pré-cloração, gerando os compostos similares aos PBTA já descritos na literatura²⁷. Os mesmos autores também estudaram a mutagenicidade dos efluentes industriais, que eram liberados no Ribeirão dos Cristais, e diversos corantes e aminas aromáticas mutagênicas foram identificadas e a contribuição dos corantes na mutagenicidade dos efluentes foi avaliada com sucesso²⁹.

TOXICIDADE DOS PBTA

Os PBTA, PBTA não clorados e os seus corantes azóicos precursores apresentam atividade mutagênica para diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* do teste de Salmonella/microsoma²⁴ (Tabela 3). Particularmente, os PBTA apresentam maior atividade mutagênica para a linhagem YG1024 na presença de sistema de ativação metabólica (mistura S9)²⁶ quando comparados com seus precursores.

Shiozawa *et al.*³⁰ avaliaram a mutagenicidade do PBTA-1 com o objetivo de elucidar a relação estrutura-atividade desse composto. Os dados sugeriram que o grupamento amino primário é essencial para a atividade mutagênica desse composto, como observado para outras aminas; por exemplo, 2-amino-3,8-dimetilimidazol[4,5-

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos PBTA

PBTA	Número CAS	Peso molecular	Ponto de fusão (°C)	Solubilidade (g/L) ^a	pKa	Volume molar (cm ³ /mol) ^d
PBTA-1	194590-84-6	542	165-166	3,3 x 10 ⁻³	13,38 (± 0,70) ^b 3,34 (± 0,50) ^c	352,4 (± 7,0)
PBTA-2	215245-16-2	507	179-181	6,6 x 10 ⁻⁴	13,25 (± 0,70) ^b 3,42 (± 0,50) ^c	321,0 (± 7,0)
PBTA-3	270925-57-0	470	231-234	9,9 x 10 ⁻³	13,32 (± 0,70) ^b 2,04 (± 0,50) ^c	268,2 (± 7,0)
PBTA-4	351995-07-8	426	> 230	97,7 x 10 ⁻³	13,31 (± 0,70) ^b 2,43 (± 0,10) ^c	230,9 (± 7,0)
PBTA-5	-	598	-	-	-	-
PBTA-6	392274-07-6	514	-	0,013	13,39 (± 0,70) ^b 3,64 (± 0,50) ^c	303,6 (± 7,0)
PBTA-7	-	482	200-202	480	-	-
PBTA-8	-	506	173-175	504	-	-

-: Dados não encontrados na literatura; a: Solubilidade em água a 25 °C em pH 7; b: pKa determinado em meio ácido a 25 °C; c: pKa determinado em meio básico a 25 °C; d: Volume molar determinado a 20 °C e pressão de 760 Torr

Tabela 3. Atividade mutagênica expressa em número de revertentes por µg dos diversos PBTA frente as diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* na presença de ativação metabólica (mistura S9)

PBTA	Linhagem de <i>Salmonella typhimurium</i> + S9	Potência (revertentes/µg)	Ref.
PBTA-1	TA98	88000	25
	TA100	630	
	YG1024	3000000	
	YG1029	36000	36
	TA1538	11446	
	YG6208	12466	
	YG6205	9024	
	YG5147	10166	
	YG6215	16928	37
PBTA-2	YG5160	4768	
	YG5161	4720	
	TA98	93000	15
	TA100	520	
PBTA-3	YG1024	3200000	
	YG1029	39000	
PBTA-4	TA98	81000	16
	YG1024	3000000	
PBTA-5	TA98	190000	7
	YG1024	7800000	
PBTA-6	TA98	56000	17
	TA100	387	
	YG1024	723000	
	YG1029	1580	
PBTA-7	TA98	17900	17
	TA100	146	
	YG1024	485000	
	YG1029	953	
PBTA-8	TA98	43000	18
	TA100	393	
	YG1024	1430000	
	YG1029	648	
PBTA-9	TA98	40700	18
	TA100	312	
	YG1024	2213000	
	YG1029	1169	

lquinoxalina (MeIQx), 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-1), 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-2), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina (PhPI) entre outras^{31,32}. Outras características moleculares do PBTA-1 relacionadas a sua atividade mutagênica são a planaridade e a presença de halogênios³⁰. Ohe *et al.*³³ determinaram o espectro de mutação dos PBTA 1 e 2 utilizando as linhagens *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 e TA104 e verificaram que os espectros obtidos foram similares entre si quando comparados aos espectros produzidos por outras aminas aromáticas genotóxicas.

O PBTA-2, na presença e na ausência de mistura S9, foi avaliado quanto a sua capacidade de induzir a formação de micronúcleos *in vitro*, em células de roedores (CHL e V79-MZ). Esse composto

apresentou resultados fracamente positivos para a linhagem CHL e fortemente positivos para a linhagem V79-MZ. Nesse trabalho também foi observado que o PBTA-2 foi capaz de induzir poliploidia em ambas culturas de células avaliadas³⁴. Um ano mais tarde (2001) Matsuoka *et al.*⁸ analisaram os PBTA 1 e 2, seus corantes azóicos precursores e os PBTA não-clorados utilizando as mesmas linhagens de células do estudo anterior, e verificaram que o PBTA-2 é mais citotóxico que o PBTA-1. O PBTA-2 e seu corante precursor induziram células binucleadas e núcleos multilobulados, respectivamente. Os autores sugeriram que outros PBTA não-clorados e os próprios PBTA teriam efeitos similares devido ao esqueleto fenilbenzotriazol comum a essa classe de compostos.

A genotoxicidade do PBTA-6 foi avaliada através dos testes de micronúcleos e do cometa em peixes (*Carassius auratus*)³⁵. Esse composto foi capaz de induzir micronúcleos em células de brânquias, principalmente nas doses de 50 e 100 mg/kg, porém não foi observado aumento na frequência de micronúcleos nos eritrócitos de sangue periférico. Para o ensaio cometa o PBTA-6 também apresentou respostas positivas. Os autores sugeriram, com base nas suas propriedades mutagênicas, que o potencial carcinogênico dos mesmos seja avaliado tanto em organismos aquáticos como em roedores³⁵.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB) realizadas em amostras ambientais podem auxiliar na identificação de novos compostos com a vantagem de priorizar aqueles que causam efeitos adversos aos organismos, a exemplo dos PBTA. Embora os PBTA apresentem efeitos genotóxicos comprovados para bactérias, peixes e culturas celulares de mamíferos a avaliação de sua toxicidade, bem como dos PBTA não-clorados, deverá ser aprofundada para se determinarem os riscos da presença dos mesmos no ambiente.

No Brasil, os PBTA e os PBTA não-clorados ainda não foram identificados em corpos de água, porém compostos de estrutura química similar aos PBTA foram detectados em águas de abastecimento público²⁷. Enquanto não se conhecem os valores seguros de exposição ambiental para os PBTA e seus precursores, métodos analíticos para sua identificação e quantificação devem ser desenvolvidos no Brasil, visando o monitoramento dos mesmos em águas que recebem efluentes de indústrias de tingimento. Medidas que visem a minimização de sua formação e/ou lançamento deveriam ser consideradas especialmente em mananciais utilizados para abastecimento público, considerando que o tratamento efetuado pelas indústrias pode não ser eficiente para sua remoção.

REFERÊNCIAS

- Hewitt, L. M.; Marvin, C. H.; *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* **2005**, 589, 208.
- Brack, W.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 397.
- Enya, T.; Suzuki, H.; Watanabe, T.; Hirayama, T.; Hisamatsu, Y.; *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 2772.
- Meier, J. R.; *Mutat. Res./Rev. Genet. Toxicol.* **1988**, 196, 211.
- Nukaya, H.; Yamashita, J.; Tsuji, K.; Terao, Y.; Ohe, T.; Sawanishi, H.; Katsuhara, T.; Kiyokawa, K.; Tezuca, M.; Oguri, A.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 1061.
- Ohe, T.; Takeuchi, N.; Watanabe, T.; Tada, A.; Nukaya, H.; Terao, Y.; Sawanishi, H.; Hirayama, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; *Environ. Health Perspect.* **1999**, 107, 701.
- Nukaya, H.; Shiozawa, T.; Tada, A.; Terao, Y.; Ohe, T.; Watanabe, T.; Asanoma, M.; Sawanishi, H.; Katsuhara, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2001**, 492, 73.
- Matsuoka, A.; Tada, A.; Terao, Y.; Nukaya, H.; Önfelt, A.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2001**, 493, 75.
- Ohe, T.; Mizuno, T.; Morisawa, T.; Kiritani, S.; Suzuki, S.; Takehana, H.; Kasetani, S.; Watanabe, T.; Nukaya, H.; Shiozawa, T.; Terao, Y.; Wakabayashi, K.; *Genes Environ.* **2006**, 28, 108.

10. Kummrow, F.; Magalhães, D.; Franco, A.; Umbuzeiro, G. A.; *Rev. Saúde Pública* **2006**, *40*, 890.
11. Umbuzeiro, G. A.; Roubicek, D. A.; Rech, C. A.; Sato, M. I. Z.; Claxton, L. D.; *Chemosphere* **2004**, *54*, 1589.
12. Roubicek, D. A.; Umbuzeiro, G. A. Em *Métodos de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce*; Mozeto, A. A.; Umbuzeiro, G. A.; Jardim, W. F., eds.; Cubo Multimídia: São Carlos, 2006, cap. 4.
13. Nukaya, H.; Tsuji, K.; Ohe, T.; Oguri, A.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1997**, *379*, 102.
14. Sakamoto, H.; Hayatsu, H.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, *44*, 521.
15. Oguri, A.; Shiozawa, T.; Terao, Y.; Nukaya, H.; Yamashita, J.; Ohe, T.; Sawanishi, H.; Katsuhara, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1195.
16. Shiozawa, T.; Tada, A.; Nukaya, H.; Watanabe, T.; Takahashi, T.; Asanoma, M.; Ohe, T.; Sawanishi, H.; Katsuhara, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; Terao, Y.; *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 535.
17. Watanabe, T.; Nukaya, H.; Terao, Y.; Takahashi, Y.; Tada, A.; Takamura, T.; Sawanishi, H.; Ohe, T.; Hirayama, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2001**, *498*, 107.
18. Watanabe, T.; Shiozawa, T.; Takahashi, Y.; Takahashi, T.; Terao, Y.; Nukaya, H.; Takamura, T.; Sawanishi, H.; Ohe, T.; Hirayama, T.; Wakabayashi, K.; *Mutagenesis* **2002**, *17*, 293.
19. Watanabe, T.; Takahashi, Y.; Takahashi, T.; Nukaya, H.; Terao, Y.; Hirayama, T.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2002**, *519*, 187.
20. Morisawa, T.; Mizuno, T.; Ohe, T.; Watanabe, T.; Hirayama, T.; Nukaya, H.; Shiozawa, T.; Terao, Y.; Sawanishi, H.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2003**, *534*, 123.
21. Moriwaki, H.; Harino, H.; Hashimoto, H.; Arakawa, R.; Ohe, T.; Yoshikura, T.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *995*, 239.
22. Moriwaki, H.; Harino, H.; Yoshikura, T.; Ohe, T.; Nukaya, H.; Terao, Y.; Sawanishi, H.; Wakabayashi, K.; Miyakoda, H.; Alary, J. F.; *J. Environ. Monit.* **2004**, *6*, 897.
23. Watanabe, T.; Ohe, T.; Hirayama, T.; *Environ. Sci.* **2005**, *12*, 325.
24. Watanabe, T.; Ohba, H.; Asanoma, M.; Hasei, T.; Takamura, T.; Terão, Y.; Shiozawa, T.; Hirayama, T.; Wakabayashi, K.; Nukaya, H.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2006**, *609*, 137.
25. Shiozawa, T.; Muraoka, K.; Nukaya, H.; Ohe, T.; Sawanishi, H.; Oguri, A.; Wakabayashi, K.; Sugimura, T.; Terao, Y.; *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 375.
26. Ohe, T.; Watanabe, T.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* **2004**, *567*, 109.
27. Oliveira, D. P.; Carneiro, P. A.; Rech, C. M.; Zanoni, M. V. B.; Claxton, L. D.; Umbuzeiro, G. A.; *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 6682.
28. Umbuzeiro, G. A.; Freeman, H. S.; Warren, S. H.; Oliveira, D. P.; Terão, Y.; Watanabe, T.; Claxton, L. D.; *Chemosphere* **2005**, *60*, 55.
29. Oliveira, D. P.; Carneiro, P. A.; Sakagami, M. K.; Zanoni, M. V. B.; Umbuzeiro, G. A.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2007**, *626*, 137.
30. Shiozawa, T.; Suyama, K.; Nakano, K.; Nukaya, H.; Sawanishi, H.; Oguri, A.; Wakabayashi, K.; Terao, Y.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1999**, *442*, 105.
31. Ohe, T.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1997**, *393*, 73.
32. Skog, K.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *802*, 39.
33. Ohe, T.; Shaughnessy, D. T.; Landi, S.; Terao, Y.; Sawanishi, H.; Nukaya, H.; Wakabayashi, K.; DeMarini, D. M.; *Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, *429*, 189.
34. Matsuoka, A.; Sakamoto, H.; Tadokoro, S.; Tada, A.; Terao, Y.; Nukaya, H.; Wakabayashi, K.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2000**, *464*, 161.
35. Masuda, S.; Deguchi, Y.; Masuda, Y.; Watanabe, T.; Nukaya, H.; Terão, Y.; Takamura, T.; Wakabayashi, K.; Kinae, N.; *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2004**, *560*, 33.
36. Kokubo, K.; Yamada, M.; Kanke, Y.; Nohmi, T.; *DNA Repair* **2005**, *4*, 1160.
37. Matsui, K.; Yamada, M.; Imai, M.; Yamamoto, K.; Nohmi, T.; *DNA Repair* **2006**, *5*, 465.