UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Perfil do impacto ecogenotoxicológico induzido após exposição
de diferentes organismos a corantes têxteis dispersos**

Gabriela Meireles

Ribeirão Preto – SP
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Perfil do impacto ecogenotoxicológico induzido após exposição de diferentes organismos a corantes têxteis dispersos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Me. Gabriela Meireles

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 08/05/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto - SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Meireles, Gabriela

Perfil do impacto ecogenotoxicológico induzido após exposição de diferentes organismos à corantes têxteis dispersos. Ribeirão Preto, 2018

127 f.:il.; 30cm

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

Orientadora: Oliveira, Danielle Palma de

1. Corantes dispersos
2. Ecotoxicidade
3. Malformações
4. Comportamento
5. Biomarcadores
6. Mutagenicidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Meireles

Perfil do impacto ecogenotoxicológico induzido após exposição de diferentes organismos a corantes têxteis dispersos

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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, irmãos e amigos, que juntos são a minha família.

Dedico este trabalho a vocês pela confiança, exemplo, amor, amizade e principalmente por me motivarem a seguir meus sonhos, mesmo quando estes me pareciam tão distantes.

“ O melhor presente que você pode dar a alguém é o seu tempo, sua atenção, sua dedicação e seu amor”

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a *Deus* pelas bênçãos, oportunidades e por estar ao meu lado sempre.

À minha orientadora, *Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira*, por todas as oportunidades, conhecimento adquirido e crescimento científico ao longo destes anos.

Ao *Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola*, da EESC/USP, por tantos ensinamentos profissionais e pessoais. Agradeço por toda confiança, incentivo e pela participação nesta pesquisa.

Ao *Prof. Dr. Carlos Alexandre Sarabando Gravato*, pela orientação durante o doutorado na Universidade de Aveiro, Portugal, pelo conhecimento compartilhado, dedicação, conselhos e confiança no meu trabalho.

Ao *Prof. Dr. Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares*, pela oportunidade de realizar parte do doutorado na Universidade de Aveiro, Portugal, contribuindo para o aprimoramento desta pesquisa.

Aos técnicos de laboratório *Amandio* (EESC/USP) e *Klaus* (FCFRP/USP) por possibilitarem não somente a execução desta pesquisa, mas também pela prestativamente, longas conversas e amizade.

Aos meus pais, *Luiz e Maria*, pela confiança, amor, apoio e por compartilharem dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, especialmente à *Cristina e Cidinha*, meus exemplos, por me ajudarem a transformar um sonho em realidade, pela confiança no meu trabalho e pelas doces ou duras palavras que me tornaram melhor.

Aos amigos *Ana Letícia, Laís, Livia, Marina, Edna, Vanessa, Raquel, Diego, Obede, Nara, Camila e Greyce*. A vocês eu tenho tanta coisa a agradecer! Obrigada pela amizade, carinho, dedicação, força e principalmente pela confiança. Vocês são parte da realização deste sonho e não existem palavras suficientes para descrever minha imensa gratidão. “Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só” (Amyr Klink).

Ao *Marcos*, pelo companheirismo, carinho, apoio e toda a ajuda na finalização deste trabalho.

Aos amigos dos laboratórios em que estive durante o doutorado, em especial à *Andréia Ávila, Cibele, Flávia, Maíra, Otávio, Sônia Dreossi, Tamires, Lilian, Mariana, Ana Maria, André, Clarice, Danilo, Felipe, Michele, Renata, Thandy, Thiago, Michiel, Bruna, Emily, Priscila, Miriam, Jefferson, Rita, Ana Patrícia, Carlos, Sônia Beleza, Andréia Rodrigues, Abel e Aline*, por toda ajuda, troca de experiências e por tornarem meus dias mais felizes.

Aos amigos da CETESB de Ribeirão de Preto: *Matheus, Adib, Joaquim, Renata, Queiroz e Tereza* pela receptividade e auxílio. Especialmente à *Fátima, Maristela, André e Eduardo* pelo grande apoio no desenvolvimento desta pesquisa, pelos ensinamentos e ótimas conversas.

Aos amigos de longa ou curta data que estiveram sempre presentes e tornaram esta jornada mais leve e divertida, em especial ao *Alexandre, Ana Carolina, Bruno, Fernanda, Heliara, Miliane, Josiane, Denise, Vinícius, Luana, Edna, Isabela, Murilo, Nayah, Caroline, Rodolfo, Bruna e Roberto*.

Às secretárias da pós-graduação, *Rosemary e Rosana*, pela dedicação, amizade, excelente trabalho desenvolvido e receptividade.

Às agências de fomento *CAPES e CNPq* (Processo: 142379/2014-0) pelo auxílio financeiro no desenvolvimento desta pesquisa e pelas oportunidades de difundir a ciência.

À *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Universidade de São Paulo* por todo suporte durante a realização do doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

MEIRELES, G. **Perfil do impacto ecogenotóxico induzido após exposição de diferentes organismos à corantes têxteis dispersos**. 2018. 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os corantes são utilizados pelo homem há mais de 20 mil anos, com emprego nas indústrias têxteis, farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, fotográficas, entre outras. Contudo, apesar de sua importância, os corantes podem ser tóxicos, mutagênicos e resistentes a muitos processos de degradação utilizados em estações de tratamento de águas residuais. Dentro deste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos dos corantes têxteis Disperse Red 60 (DR 60), Disperse Red 73 (DR 73) e Disperse Red 78 (DR 78) por meio de testes de toxicidade em três organismos de diferentes níveis tróficos: a bactéria *Vibrio fischeri*, o microcrustáceo *Daphnia similis* e o peixe *Danio rerio* (zebrafish), além da mutagenicidade na bactéria *Salmonella typhimurium*. Nossos resultados mostraram que os corantes DR 73 e DR 78 induzem toxicidade aguda em *Vibrio fischeri* e *Daphnia similis*, reduzindo a luminescência da bactéria e causando imobilidade no microcrustáceo, ao passo que o corante Disperse Red 60 não altera esses *endpoints*. No entanto, todos os corantes causam efeitos tóxicos em embriões e larvas de *Danio rerio*. O corante DR 60 ocasionou edemas oculares, alteração no comportamento e indução de efeitos pró-oxidantes em zebrafish. O corante DR 73 reduziu a inflação da bexiga natatória, induziu edemas do pericárdio, promoveu escoliose e alteração no saco vitelínico. Além disso, os corantes DR 73 e DR 78 alteraram o comportamento e balanço energético, induziram efeitos pró-oxidantes e neurotoxicidade. Quanto à mutagenicidade, o corante DR 73 induziu deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de base, enquanto o corante DR 78 causou apenas deslocamento do quadro de leitura e o corante DR 60 não induziu mutagenicidade. Em conclusão, os corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78 foram os mais tóxicos para os organismos avaliados, uma vez que alteraram maior número de *endpoints*, assim como causaram efeitos em menores concentrações, a partir de 1 µg/L. Este estudo também demonstra a importância do uso de organismos testes de diferentes níveis tróficos, bem como a necessidade de uma maior atenção quanto ao registro e liberação para uso de corantes, visando prevenir danos ao ambiente e à saúde humana.

Palavras-chave: corantes dispersos; ecotoxicidade, malformações, comportamento, biomarcadores, mutagenicidade.

ABSTRACT

MEIRELES, G. **Ecogenotoxicological effects of three disperse textile dyes to a test battery of organisms from different trophic levels.** 2018. 127f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Dyes have been used for more than twenty thousand years in the textile, pharmaceutical, food, cosmetic, and photographic industry, among others. Despite their importance in these applications, dyes can be toxic, mutagenic and resistant to many degradation processes used in wastewater treatment plants. In this context, the aim of this research was to evaluate the ecotoxicological effects of the Disperse Red 60 (DR 60), Disperse Red 73 (DR 73) and Disperse Red 78 (DR 78) textile dyes by means of toxicity tests on three organisms of different trophic levels: the bacterium *Vibrio fischeri*, the microcrustacean *Daphnia similis* and the fish *Danio rerio* (zebrafish). In addition, the mutagenicity of these dyes to the bacterium *Salmonella typhimurium* was evaluated. Our results demonstrate that the dyes DR 73 and DR 78 induce acute toxicity to *V. fischeri* (luminescence reduction) and *D. similis* (immobility), whereas the DR 60 did not alter these endpoints at the concentrations tested. However, all dyes caused toxic effects on embryos and larvae of *D. rerio*. DR 60 caused ocular edema, altered behavior and induced pro-oxidant effects in zebrafish. DR 73 reduced swim bladder inflation, induced pericardial edema, promoted scoliosis and changes in yolk sacs. In addition, DR 73 and DR 78 altered the zebrafish juvenile behavior and energy balance, and induced pro-oxidant effects and neurotoxicity. As for the mutagenicity test, DR 73 induced frameshift and base pair substitution, whereas DR 78 caused only frameshift and DR 60 did not induce any mutagenic effects. In conclusion, DR 73 and DR 78 were the most toxic for the organisms tested since they altered a greater number of endpoints and caused toxic effects at lower concentrations, i.e. from 1 µg/L onwards. These results indicate the importance of using a battery of test organisms from different trophic levels when evaluating the environmental risks of dyes, as well as the need for greater attention regarding the Registration and authorization of the use of dyes in order to prevent unacceptable risks to the environment and human health.

Keywords: disperse dyes, ecotoxicity, malformations, behavior, biomarkers, mutagenicity.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Corantes: histórico de uso e impactos ambientais	1
1.2 Classificação dos corantes	3
1.3 Toxicidade dos corantes.....	4
1.4 Corantes estudados.....	7
1.5 Ensaio de toxicidade.....	9
1.5.1 Ensaio de inibição da luminescência com <i>Vibrio fischeri</i>	9
1.5.2 Ensaio com microcrustáceos zooplânctônicos	10
1.5.3 Ensaio com <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	11
1.5.3.1 Teste de embriotoxicidade (FET)	12
1.5.3.2 Ensaio de comportamento	16
1.5.3.3 Ensaio com biomarcadores bioquímicos.....	16
1.5.4 Ensaio de mutagenicidade com <i>Salmonella typhimurium</i>	19
2 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

1.1 Corantes: histórico de uso e impactos ambientais

Os corantes são utilizados pela humanidade há mais de 20 mil anos, sendo que o primeiro foi o negro de fumo (*Carbon Black*), obtido por meio da combustão incompleta de hidrocarbonetos. Até a metade do século XIX, todos os corantes conhecidos provinham de fontes naturais, sendo que a maioria era obtida de fontes vegetais, como o índigo obtido da planta *Isatis tinctoria* e, um menor número de origem animal, como o composto vermelho extraído do caramujo marinho *Murex*. No entanto, a limitada variedade, além da instabilidade da cor obtida com corantes naturais demandou a síntese de novos compostos BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011; WORD DYES & ORGANIC PIGMENTS, 2018; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2017).

O primeiro corante orgânico sintético, Mauve, foi produzido por Willian Henry Perkin em 1856, na Inglaterra, por meio da oxidação da fenilamina com dicromato de potássio. No início de 1900, cerca de 85% da demanda mundial de corantes era produzida na Alemanha. Porém, durante o período da Primeira Guerra Mundial, a atenção das fábricas alemãs voltou-se aos explosivos, incentivando a produção de corantes por outros países, por se tratar de um mercado economicamente atraente. Aos poucos, devido aos menores custos de produção conseguidos nesta região, o polo de corantes migrou para a Ásia. A partir de então, esse setor ampliou-se continuamente, com a demanda mundial atual em crescimento exponencial com taxas de 6% ao ano e uma estimativa de movimentação de aproximadamente US\$ 20 bilhões durante o ano de 2019 (SMITH; KANAWA, 2008; BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011; WORD DYES & ORGANIC PIGMENTS, 2018; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2017).

Os corantes são utilizados nas indústrias têxtil, farmacêutica, alimentícia, cosmética, de papel e fotográfica, entre outras (GONEN; AKSU, 2009; TILLI et al., 2011). No entanto, a indústria têxtil é responsável pelo consumo de dois terços do mercado total de corantes (ŠAFAŘÍKOVÁ et al., 2005). Para suprir esta demanda, existem cerca de 10.000 diferentes corantes empregados industrialmente a fim atender às exigências do mercado consumidor que busca estabilidade da cor e diversidade de tons (ROBINSON et al. 2001). Mais de 700.000 toneladas destes compostos são consumidas anualmente no mundo, das quais cerca de 26.500 toneladas apenas no Brasil (KUNZ et al., 2002; SOUZA; FORGIARINI; SOUZA,

2007). No entanto, durante a fabricação e processamento dos corantes pode ocorrer uma perda de 2 a 50% para os efluentes e cerca de 20% desta quantidade atinge o ambiente aquático (O'NEILL et al., 1999; CHI; CHEN; LIU, 2009).

Atualmente, há no Brasil cerca de trinta mil empresas têxteis consumidoras de corantes, que geram mais de 1,5 milhões de empregos diretos e 8 milhões indiretos. Este setor é o 2º maior empregador da indústria de transformação, com um faturamento anual de US\$ 37 bilhões. Com isso, o Brasil se posiciona como o quinto maior produtor têxtil do mundo e o único no Ocidente com cadeia completa, que engloba desde a produção de fibras até os desfiles de moda (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO, 2017).

Apesar de sua grande importância econômica, o setor têxtil contribui para o agravamento de diversos problemas ambientais, com grande consumo de água (cerca de 150 litros para cada quilo de algodão tingido) e geração de um volume considerável de efluentes contendo resíduos de composição diversa, o que o torna o mais poluente dentre todos os setores industriais. Dentre as diferentes substâncias encontradas nos efluentes têxteis, destacam-se sais, aditivos, detergentes, surfactantes e principalmente os corantes, o que dificulta seu tratamento (ROBINSON et al., 2001; HAI; YAMAMOTO; FUKUSHI, 2006; JADHAV et al., 2010; ANASTASI et al., 2011). Os corantes correspondem a 20% da poluição total de águas residuárias e os efluentes que os contêm são considerados por alguns autores como um dos mais graves problemas ambientais do mundo (KANT, 2012; PRZYSTAS; ZABLOCKA-GODLEWSKA; GRABINSKA-SOTA, 2015).

Medidas legislativas pouco restritivas levaram à disseminação do uso de corantes tóxicos, afetando cerca de 40% da população global que vive em países como China, Índia e Bangladesh, que atendem cerca de 50% da demanda mundial de tingimento (GHALY et al., 2014). Além disso, são comuns exemplos como o do Brasil, em que uma parte expressiva das empresas do ramo têxtil é de pequeno porte, o que dificulta a fiscalização (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes são aprovados para o uso apenas com base na toxicidade do produto primário. Porém, características como a salinidade dos efluentes têm implicações na estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana responsável pela degradação dos compostos. Por exemplo, em estudo recente, RAWAT et al. (2017), mostraram que, em condições salinas, os microorganismos são capazes de biotransformar um corante inicialmente não tóxico (Acid Orange 7) em compostos

tóxicos, induzindo a alteração de parâmetros moleculares, celulares e individuais de *Allium cepa*. Logo, a aprovação dos corantes com base apenas na toxicidade do produto primário pode estar subestimando os reais efeitos deletérios dos mesmos.

Adicionalmente, os tratamentos convencionais utilizados em estações de tratamento de efluentes de indústrias têxteis, como as lagoas aeróbicas ou de lodo ativado, não são eficientes na remoção ou degradação dos corantes. Nesses procedimentos, há comumente uma preocupação apenas com a redução de cor, nível de oxigênio e produtividade biológica do corpo receptor, sem considerar as interações entre os fatores bióticos e abióticos que podem ocorrer, como a formação de produtos tóxicos, como aminas aromáticas, culminando na presença dessas substâncias em efluentes tratados, sedimentos e rios (ROBINSON et al., 2001; VACCHI et al., 2016; RAWAT et al., 2017).

1.2 Classificação dos corantes

Os corantes são compostos capazes de conferir coloração a diferentes substratos. A cor dos corantes depende da sua capacidade de absorver a luz na região do espectro visível (400-700 nm) e é causada pela excitação dos elétrons π na camada de valência pela luz visível (MURRELL, 1973; BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011). Esses compostos se ligam aos materiais por adsorção, dissolução, retenção, ligações químicas iônicas ou covalentes (GUARATINI; ZANONI, 2000; IQBAL, 2008; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2017).

Os corantes apresentam grupos de átomos responsáveis pela coloração, chamados de cromóforos (azo, antraquinona, ftalocianina e outros), bem como substituintes que intensificam a coloração e lhes conferem solubilidade, denominados auxocromos (amino, sulfônico, carboxílico e outros) (SANTOS et al., 2007). Não há uma nomenclatura sistemática para os corantes, apenas um índice de cor (Color Index) onde é atribuído um número a cada composto, facilitando sua identificação (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011).

Os corantes são classificados de acordo com sua estrutura química (azo, antraquinona, ftalocianina e outros) ou com o método pelo qual é fixado à fibra têxtil (reativos, diretos, azóicos, ácidos, à cuba, de enxofre, dispersos, pré metalizados e branqueadores) (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Na presente pesquisa foram avaliados apenas os corantes dispersos ou dispersivos, que são substâncias orgânicas, insolúveis em água e de baixo peso molecular, amplamente utilizadas no tingimento de produtos têxteis, brinquedos, papéis e outros (GUARATINI; ZANONI, 2000; ZHOU; DU; ZHANG, 2013). Esta classe de corantes destacou-se após o período da Primeira Guerra Mundial (1914-1918), com a fabricação de fibras sintéticas, como acetato de celulose, poliéster e nylon, devido a suas características hidrofóbicas (KOH, 2011). Durante o processo de tingimento com corantes dispersos, o composto é hidrolisado e sua forma insolúvel é precipitada como dispersa sobre a fibra sintética. O processo ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias, que estabilizam a suspensão do corante e, em altas temperaturas, facilitando o tingimento (GOLOB; TUSIEK, 1999; GUARATINI; ZANONI, 2000). A lignina sulfonada é um dos principais agentes dispersantes utilizados no tingimento com corantes dispersos, devido ao seu baixo custo e disponibilidade (TEHRANI-BAGHA; HOLMBERG, 2013).

A maior parte dos corantes dispersos apresenta grupo cromóforo azo, que corresponde a 70% dos corantes produzidos (CARLIELL et al., 1998; MANSOUR et al., 2007). Essas substâncias se caracterizam pela presença de uma ou mais ligações azo ($N=N$) associadas a estruturas aromáticas (KUNZ et al., 2002). O sucesso dessa classe de corantes se deve, dentre outros, ao processo simples de síntese e a sua grande diversidade estrutural (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011). Os corantes do tipo antraquinona aparecem como a segunda classe mais utilizada (VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998; CARMEN; DANIELA, 2012).

1.3 Toxicidade dos corantes

A toxicidade aguda dos azo corantes é comumente baixa, porém são capazes de induzir muitos efeitos crônicos (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011). Esses compostos são conhecidos por induzirem citotoxicidade, teratogenicidade e genotoxicidade (AL-SABTI, 2000; JÄGER; HAFNER; SCHNEIDER, 2004; UMBUZEIRO et al., 2005; TSUBOY et al., 2007; CHEQUER, et al., 2009; FERRAZ et al., 2011; VACCHI et al., 2013; MATHIEU-DENONCOURT et al., 2014; LEME et al., 2015; FERNANDES; BUSTOS-OBREGON; SALVADORI, 2015; OLIVEIRA et al., 2016; VENTURA-CAMARGO, ANJELIS; MARIN-MORALES, 2016; ABE et al., 2017a, FRANCO et al., 2018). Além disso, os corantes dispersos induzem

dermatites de contato e alergias, como apresentado na revisão de Malinauskiene et al. (2012).

Em organismos aquáticos, os azo corantes são capazes de induzir diferentes efeitos tóxicos. O azo corante Disperse Yellow 7, na concentração de 22 µg/ L (em água) e 1 µg/g (sedimento), reduz a sobrevivência, induz malformações e altera a expressão gênica em larvas do anfíbio *Silurana tropicalis* (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2014). Ao passo que os corantes Disperse Red 1 e Congo Red causam alterações bioquímicas no cladócero *Daphnia similis* e redução da sobrevivência e fertilidade em *Ceriodaphnia dubia*, respectivamente (YU et al., 2015; HERNÁNDEZ-ZAMORA et al., 2016).

Os azo corantes também são capazes de induzir toxicidade em peixes. Disperse Yellow 7 e Sudan Red G reduzem a sobrevivência de larvas de *Pimephales promelas*, com Concentração Letal (CL₅₀) de 25,4 e 16,7 µg/ L, respectivamente (PARROTT, BARTLETT E BALAKRISHNAN (2016). Darsana et al. (2015) também demonstraram que o azo corante Reactive Red 120 é um composto nocivo para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), causando toxicidade aguda nos organismos expostos (CL₅₀: 78,4 mg/L). Os azo corantes Direct Blending Rebine, Direct Blending Scarlett e Direct Blending Yellow também são capazes de alterar os níveis da catalase, superóxido dismutase e malondialdeído no peixe *Carassius auratus* a partir da concentração de 10,0 mg/L (LI et al., 2012). Em um estudo recente realizado por Belpaire et al. (2015), em 91 rios, canais e lagos belgas durante nove anos, os autores verificaram que enguias européias (*Anguilla anguilla*) estavam contaminadas por corantes em 77% dos locais amostrados. A presença destes compostos nestes animais pode constituir uma ameaça à vida desta espécie criticamente ameaçada de extinção, além de as tornarem impróprias para o consumo (BELPAIRE et al., 2015).

Nos ecossistemas terrestres, os azo corantes são conhecidos por seus efeitos sobre os vegetais, inibindo sua germinação, afetando o crescimento de plantas, prejudicando a sobrevivência das mudas e o alongamento das raízes (PUVANESWARI et al., 2006).

Os azo corantes também têm sido apontados por sua atividade anti estrogênica, agindo como desreguladores endócrinos, o que aumenta a preocupação com seu uso (BAZIN et al., 2012). Além disso, esses compostos podem induzir alterações morfológicas em espermatozóides, redução da fertilidade e

de células germinativas, ocasionando danos no DNA em células testiculares, como observado por meio da administração dos corantes Disperse Red 1 e Congo Red em roedores (GRAY et al., 1992; FERNANDES; BUSTOS-OBREGON; SALVADORI, 2015).

É importante considerar ainda que a biotransformação dos azo corantes pode gerar compostos de elevada toxicidade, como aminas e benzidinas, com potencial mutagênico (GUARATINI; ZANONI, 2000). O homem está exposto a aminas aromáticas provenientes de azo corantes por meio da metabolização destes compostos, realizada pela microbiota intestinal ou cutânea (BAFANA; DEVI; CHAKRABARTI, 2011). Piolatto et al. (1991), por exemplo, em um estudo com trabalhadores expostos a corantes à base de benzidina, verificaram um aumento de 30 vezes nos casos de câncer de bexiga e um aumento menor para câncer do trato digestório e respiratório.

A União Europeia banuiu o uso de azo corantes à base de benzidina desde 2003 (UNIÃO EUROPEIA, 2002; GOLKA; KOPPS; MYSLAK, 2004). No entanto, países como Brasil, México e Argentina não cessaram a produção destes corantes (GUARATINI; ZANONI, 2000). A benzidina, por exemplo, já foi detectada em efluentes têxteis de empresas localizadas no Brasil, indicando que estes compostos ainda estão presentes nos processos de tingimento (MAZZO et al., 2006). Outro fator agravante com relação aos azo corantes é sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar, causando danos em diferentes níveis tróficos (WEISBURGER, 2002).

Outros estudos, como o de Novotný et al. (2006), avaliaram a toxicidade de quatro corantes (dois azo e dois antraquinona) e observaram que o corante antraquinona Disperse Blue 3, foi o mais tóxico para a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapita* e o protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis*, além de induzir efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium*. Por outro lado, Wang et al. (2009), ao investigarem a toxicidade de 14 derivados de corante do tipo antraquinona, observaram que nenhum foi tóxico para *Daphnia magna* em condições de ausência de luz, mas, em sua presença, 11 dessas substâncias induziram toxicidade aguda ao microcrustáceo.

Os corantes do tipo antraquinona também estão relacionados a efeitos adversos, como é o caso de Disperse Blue 1, que está diretamente associado ao câncer de bexiga urinária em animais (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM,

2011). Outros estudos, como o de Chaudhari et al. (2017), demonstraram que o corante antroquinona Reactive Blue 4 reduz a taxa de crescimento da raiz e germinação da planta *Triticum sp.*, a viabilidade de queratinócitos humanos (células HaCat) e células epiteliais de peixe, assim como induz genotoxicidade em linfócitos e queratinócitos humanos e células epiteliais de peixe, a partir da oncentração de 0.01 mg/L. Além disso, os corantes do tipo antraquinona são mais resistentes aos processos de biodegradação quando comparado aos azo corantes (HOLKAR et al., 2014). Dessa forma, os corantes são um risco para os organismos aquáticos e terrestres, bem como para os seres humanos (GHALY et al., 2014).

1.4 Corantes estudados

Apesar do grande número de corantes disponíveis, de seu crescente emprego em diferentes setores e do consequente lançamento de elevada quantidade de resíduos principalmente nos ecossistemas aquáticos, estudos sobre a toxicidade dessas substâncias ainda são escassos (CROCE et al., 2017) e poucos trabalhos mensuraram a concentração de corantes em corpos d'água (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2014). Em uma pesquisa realizada no rio Yamaska, Quebec, Canadá, os autores Maguire e Tkacz (1991) detectaram 15 corantes em amostras de água, sedimento e sólidos em suspensão, identificando apenas Disperse Blue 26, Disperse Blue 79 e Disperse Red 60 (objeto de estudo) em concentrações que variaram entre 3-17 µg/L. No Brasil, também já foram detectados corantes dispersos, como Disperse Red 1, Disperse Blue 373 e Disperse Violet 93, em amostras provenientes do Ribeirão dos Cristais e do Rio Piracicaba, sendo que a concentração destes compostos variou de 0,002 a 3,5 µg/L (CARNEIRO et al., 2010; ZOCCOLO et al., 2015).

Dentre os diferentes tipos de corantes, a presente pesquisa enfatizou a análise dos efeitos de Disperse Red 60, Disperse Red 73 e Disperse Red 78. Excetuando-se o Disperse Red 60, o qual já foi identificado em corpos de água no Canadá (MAGUIRE; TKACZ, 1991) e em efluentes no Brasil (ZANONI, comunicação pessoal, 2014), para os demais não existia registro de dados sobre ocorrência dos mesmos no ambiente. Embora o potencial de toxicidade dos três corantes seja reconhecido pelas suas características, são raros os registros em literatura sobre seus efeitos deletérios na saúde humana e dos ecossistemas, o que justificou a realização da presente pesquisa.

Adicionalmente, os corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78 foram selecionados pela semelhança estrutural entre as estruturas químicas, buscando avaliar se pequenas diferenças estruturais são capazes de alterar a toxicidade do composto. A única diferença entre eles é a presença de um grupamento ciano (CN) na posição 2 do primeiro anel aromático no corante Disperse Red 73 ao invés de um átomo de cloro (Cl) , encontrado no Disperse Red 78 (Figura 1).

Figura 1 - Características e estruturas moleculares dos corantes têxteis avaliados.

Disperse Red 60

Fórmula molecular: $C_{20}H_{13}NO_4$

Peso molecular: 331,32 g/mol

Pureza: 60-80%

Empresa: Huntsman Textile Effects

Disperse Red 73

Fórmula molecular: $C_{18}H_{16}N_6O_2$

Peso molecular: 348,46 g/mol

Pureza: 60-80%

Empresa: Classic Dyestuff, Inc (EUA)

Disperse Red 78

Fórmula molecular: $C_{17}H_{16}ClN_5O_2$

Peso molecular: 357,71 g/mol

Pureza: 60-80%

Empresa: Classic Dyestuff, Inc (EUA)

1.5 Ensaios de toxicidade

1.5.1 Ensaio de inibição da luminescência com *Vibrio fischeri*

Os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas muito úteis na identificação de impactos ambientais e têm se mostrado uma alternativa importante para a avaliação global da contaminação aquática. Esses ensaios são caracterizados como complementos ideais para as análises químicas de identificação e avaliação da toxicidade, pois mensuram mudanças na fisiologia, no metabolismo ou no comportamento dos organismos vivos resultantes de estresse induzidos por compostos químicos ou biológicos (MA et al., 1999; GIROTTI et al., 2008).

Estes ensaios comumente são classificados como agudos ou crônicos, diferindo entre si pela duração e pelas respostas avaliadas. Os ensaios de toxicidade aguda mensuram os efeitos severos, como imobilidade ou mortalidade dos organismos expostos ao contaminante por um curto período de tempo, geralmente de 24 a 96 horas, para ensaios com organismos aquáticos. Por outro lado, os ensaios crônicos avaliam os efeitos decorrentes de exposições a concentrações subletais do agente tóxico por todo ou parte do ciclo de vida do organismo. Nestes ensaios é possível avaliar os efeitos de concentrações que não afetam a sobrevivência dos organismos, mas podem comprometer outras funções biológicas, como reprodução e crescimento, por exemplo (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006; COSTA et al., 2008).

Diferentes organismos podem ser empregados na avaliação da toxicidade. No entanto, é importante apresentar algumas características como seletividade e sensibilidade constante aos contaminantes, elevada disponibilidade e abundância, estabilidade genética, representatividade no seu nível trófico, importância ambiental e comercial, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório e, finalmente, ter a sua biologia conhecida. Dentre os organismos teste, as bactérias, algas, crustáceos e peixes são mais os mais utilizados e difundidos (COSTA et al., 2008). Neste estudo, não foram realizados ensaios com algas, por isso as seções seguintes tratam apenas de ensaios com bactérias, crustáceos e peixes.

Vibrio fischeri é uma bactéria marinha luminescente internacionalmente usada e padronizada em ensaios de toxicidade (FARRÉ et al., 2001). A luminescência é produto da respiração celular e de processos metabólicos, os quais são influenciados pela presença de diversas substâncias tóxicas, que podem interagir em diferentes níveis celulares, como membrana celular, cadeia de transporte de

elétrons e constituintes citoplasmáticos. Essas interações podem levar à redução da luminescência de espécies como a bactéria marinha *Vibrio fischeri*, com a possibilidade de mensuração (Figura 2). Esse ensaio é um bom indicador de atividade metabólica, apresenta boa correlação com muitos testes de toxicidade *in vivo* e tem sido utilizado como o primeiro teste em uma bateria de ensaios na avaliação da toxicidade, devido principalmente ao tempo de análise (5-30 minutos), sensibilidade, reprodutibilidade, baixo custo e pequena amostra requerida, auxiliando na identificação de compostos tóxicos (MA et al., 1999; BIZANI et al., 2006; PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2008; GIROTTI et al., 2008, BONNET et al., 2008; BRIX et al., 2009; FERRAZ; GRANDO; OLIVEIRA, 2011).

Figura 2 - Representação do ensaio de inibição da luminescência de *Vibrio fischeri*

Fonte: <https://dnr.mo.gov/env/esp/wqm/images/microtox2.JPG> (acesso em 2017)

1.5.2 Ensaio com microcrustáceos zooplanctônicos

Microcrustáceos zooplanctônicos estão entre os grupos mais sensíveis a agentes estressores (GUTIERREZ; PAGGI; GAGNETEN, 2012). Dentre os microcrustáceos, os cladóceros são globalmente utilizados como organismos teste em avaliações ecotoxicológicas, principalmente pelo pequeno tamanho, sensibilidade a várias substâncias tóxicas, reprodução partenogenética, ampla distribuição, elevada densidade e rápido crescimento populacional (SARMA; NANDINI, 2006). *Daphnia* e *Ceriodaphnia* (Crustacea, Cladocera), comumente chamadas de pulga d'água, são organismos filtradores que se alimentam de algas, bactérias e matéria orgânica. São encontrados em ambientes aquáticos e ocupam uma importante posição na cadeia alimentar, pois constituem uma das principais

fontes de alimento para peixes e invertebrados predadores. Além disso, tem importante papel no controle populacional de algas, que podem interferir na qualidade dos corpos d'água (TATARAZAKO; ODA, 2007). Logo, dafinídeos são espécies chave em ecossistemas lênticos (MOST et al., 2015).

Esses organismos se reproduzem partenogeneticamente, no entanto, em condições desfavoráveis ou de estresse, como falta de alimento, superpopulação ou mudanças ambientais, podem aparecer ovos de resistência e machos (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Muitas espécies do gênero *Daphnia* são empregadas nos ensaios de toxicidade, sendo que *Daphnia magna* é a mais utilizada. No Brasil, a espécie *Daphnia similis* tem sido amplamente empregada na avaliação da toxicidade aguda de diferentes compostos e amostras ambientais (Figura 3). Embora essa espécie não ocorra naturalmente em nosso país, ela é facilmente cultivada sob as condições de laboratório e apresenta sensibilidade muito semelhante à *Daphnia magna* (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004; COSTA et al., 2008). Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* mensuram os valores de concentração que causam efeitos, como a imobilidade, em 50% dos organismos expostos após um período de 24 ou 48 horas (ABNT, 2016).

Figura 3 - Exemplar de *Daphnia similis*

Fonte: <http://www.aplysia.com.br/pt/servicos/areas/ecotoxicologia/15-ensaios-ecotoxicologicos/>

1.5.3 Ensaios com *Danio rerio* (zebrafish)

Os peixes apresentam características relevantes que permitem seu uso como organismo-teste, além da sua importância ecológica e econômica. Esses organismos podem absorver os contaminantes diretamente pela água através da derme e brânquias ou ainda pela ingestão de alimentos contaminados, podendo ocorrer

bioacumulação nos tecidos (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995). Dentre os diferentes peixes empregados como organismo-teste, a espécie *Danio rerio* ou *zebrafish* tem recebido destaque, não somente em ensaios ecotoxicológicos que visam a saúde dos ecossistemas e manutenção de sua diversidade e processos ecológicos associados, mas também em testes relacionados à proteção da saúde humana. *Danio rerio* é um teleósteo, com tamanho entre 3-4 cm, tropical de água doce pertencente à família Cyprinidae. Seu corpo apresenta listras pretas e brancas e os machos são comumente mais delgados e escuros que as fêmeas (LAWRENCE, 2007; SPENCE et al., 2008) (Figura 4).

Figura 4 - Exemplares de *Danio rerio*

Fonte: <https://www.ufrgs.br/ecotox/wp-content/uploads/Figuras/couple-danio-rerio.jpg>

Segundo os princípios dos 3R (Reduction, Replacement, Refinement) publicado por Russel e Burch em 1959, os experimentos devem utilizar o menor número de animais, substituir sempre que possível o uso de vertebrados e empregar técnicas que minimizam a dor, sofrimento ou estresse, por isso, nas últimas décadas, tem-se buscado métodos alternativos à experimentação animal (BRAUNBECK et al., 2005; SCHOLZ et al., 2013). Cabe ressaltar ainda que a atual legislação europeia considera os ensaios com os estágios iniciais de desenvolvimento de *zebrafish* (até 96 hpf) um método alternativo à experimentação animal, uma vez que, nesta fase, não é necessária alimentação exógena (DIRECTIVE 2010/63/EU).

1.5.3.1 Teste de embriotoxicidade (FET)

Zebrafish tem sido o principal modelo para estudar os processos de desenvolvimento em vertebrados devido ao rápido desenvolvimento embrionário, transparência dos embriões, tamanho pequeno, facilidade de manutenção em

laboratório, produção de grande número de embriões, dentre outras características (GLASS; DAHM, 2004; LIU et al., 2007). Além disso, o genoma do *zebrafish* está completamente caracterizado e, de acordo com um artigo publicado na revista Nature em 2013, aproximadamente 70% dos genes humanos estão relacionados aos genes encontrados em *zebrafish* (HOWE et al., 2013). Com isso, esse organismo tem sido amplamente empregado como modelo no estudo de doenças humanas (GOLDSMITH, 2004; LIESCHKE; CURRIE, 2007; XU; ZON, 2010; SANTORIELLO; ZON, 2012).

O teste com embriões de peixes (*Fish Embryo Toxicity, FET*) tem sido considerado uma alternativa aos ensaios com peixes adultos, pois sabe-se que as fases iniciais do desenvolvimento dos peixes, embrionária e larval, são mais sensíveis quando comparadas com organismos adultos (BOURRACHOT; SIMON; GILBIN, 2008; BELANGER, BALON; RAWLINGS, 2010). Adicionalmente, o crescimento destes organismos pode ser avaliado e a duração da exposição é menor do que ensaios que envolvem o ciclo de vida, tornando este método mais prático na avaliação de uma variedade de compostos (PARROTT; BARTLETT E BALAKRISHNAN, 2016).

O ensaio de embriotoxicidade com peixes (FET) foi proposto por Nagel (2002) com a premissa de monitoramento diário dos organismos, desde a exposição dos ovos até a fase larval, observando parâmetros de letalidade, subletalidade e teratogenicidade, como coagulação, batimentos cardíacos, desprendimento da cauda, formação dos somitos, circulação sanguínea, desenvolvimento dos olhos, inflação da bexiga natatória, malformações, escoliose, dentre outros (Figura 5).

Figura 5 - Estágios de desenvolvimento de *Danio rerio*

Fonte: Adaptado de He et al. (2014)

Ainda há poucos registros na literatura sobre os efeitos tóxicos de corantes em embriões e larvas de *Danio rerio*. Até a data de entrega da tese foram encontrados apenas sete artigos científicos relatando estes efeitos, sendo 5 do nosso grupo de pesquisa, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Toxicidade de corantes a embriões e larvas de *Danio rerio* publicados em periódicos até dezembro de 2017

Corante	Classe	Efeito tóxico	Referência
HC Orange	Fenólico	Letalidade, gastrulação incompleta, ausência de movimentos espontâneos, não desenvolvimento dos otólitos e melanócitos e alteração na eclosão	Liu et al. (2007)
Basic Violet 14	Trifenilmetano	Atraso na absorção do saco vitelínico e inflação da bexiga natatória; hepatotoxicidade	Shen et al. (2015)
Direct Red 28	Azo	Atraso na absorção do saco vitelínico e inflação da bexiga natatória	Shen et al. (2015)
Acid Red 26	Azo	Atraso na absorção do saco vitelínico e inflação da bexiga natatória; toxicidade cardiovascular	Shen et al. (2015)
Direct Black 38	Azo	Não inflação da bexiga natatória e cauda curva	Oliveira et al. (2016)
Reactive Blue 15	Cobreftalocianina	Não inflação da bexiga natatória	Oliveira et al. (2016)
Reactive Orange 16	Azo	Atraso na eclosão e inflação da bexiga natatória	Oliveira et al. (2016)
Vat Green 3	Antraquinona	Edema do saco vitelínico e não inflação da bexiga natatória	Oliveira et al. (2016)
Acid Black 210	Azo	Sem efeitos observados nas condições avaliadas	Rocha et al (2017)
Basic Red 51	Azo	Saco vitelínico anormal, alteração do comportamento natatório, aumento da atividade da GST e CAT, aumento da GT, peroxidação lipídica, redução da EC e aumento da AEC	Abe et al. (2017a); Abe et al. (2017b) Abe et al (2017c)
Eritrostomina	Naftoquinona	Saco vitelínico anormal, edema no saco vitelínico e de pericárdio, alteração do comportamento natatório, aumento da atividade da GST, peroxidação lipídica, redução da EC, aumento da AEC e redução da atividade da AChE	Abe et al. (2017a); Abe et al. (2017b) Abe et al (2017c)
GST: glutathione S-transferase		EC: energia consumida	
CAT: catalase		AEC: alocação de energia celular	
GT: glutathione total		AChE: acetilcolinesterase	

1.5.3.2 Ensaios de comportamento

A locomoção de *zebrafish* tem sido utilizada como *endpoint* na avaliação da neurotoxicidade e toxicidade subletal de poluentes, pois sabe-se que a velocidade de natação está associada a atividade de neurotransmissores, bioacumulação, produção de energia e alterações na locomoção podem envolver depleção de oxigênio, incapacidade de remover metabólitos, processos enzimáticos, dentre outros (ANDRADE et al., 2016; HENRIQUES et al., 2016).

Alterações no comportamento causadas por substâncias tóxicas podem modificar funções ecológicas. Por isso, elas devem ser vistas como sinais de alerta de estresse, já que os organismos afetados apresentam atividade reduzida na busca de alimento e refúgios, assim como comprometimento na fuga de predadores (BURGESS; GRANATO, 2007; RODRIGUES et al., 2016). Adicionalmente, alterações no desenvolvimento, como a não inflação da bexiga natatória e malformações no saco vitelínico, processos de detoxificação e danos neurológicos podem alterar o comportamento dos organismos (MACPHAIL et al., 2009; ANDRADE et al., 2016, ABE et al., 2017a).

Os ensaios comportamentais que utilizam um sistema de monitoramento de alto rendimento realizam uma varredura do movimento dos organismos por gravação de vídeo, fornecendo informações como distância percorrida, tempo e velocidade de natação (Figura 6).

Figura 6 - Larvas de *Danio rerio* com 144 horas pós fertilização em placas de cultura

Fonte: próprio autor

1.5.3.3 Ensaio com biomarcadores bioquímicos

Um marcador bioquímico pode ser definido como um parâmetro biológico que se altera como resposta à exposição a determinados toxicantes, indicando uma

modificação no estado normal do organismo, sendo muito sensíveis quando comparados a outros *endpoints* como letalidade, por serem os primeiros a responderem frente a alterações ambientais. Além disso, a avaliação de biomarcadores pode auxiliar na previsão de mudanças no nível populacional (CHAMBERS et al., 2002; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

Estudos têm mostrado que alterações em biomarcadores bioquímicos podem ocorrer em concentrações muito menores comparadas com os ensaios de desenvolvimento de *zebrafish*, tornando esta ferramenta muito importante na avaliação dos efeitos tóxicos de diferentes contaminantes (OLIVEIRA et al. 2009; ANDRADE et al., 2016). Adicionalmente, sabe-se que os corantes também são capazes de modificar biomarcadores bioquímicos em larvas de *zebrafish* (ABE et al., 2017b; ABE et al., 2017c).

As colinesterases estão entre os marcadores bioquímicos mais avaliados, especialmente para identificação de compostos neurotóxicos (HABIG; DIGIULIO, 1991; OLSEN et al., 2001), apresentando duas funções principais: atuando nas sinapses colinérgicas por meio da rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina no sistema nervoso central e periférico e em alguns tecidos não colinérgicos, no processo de degradação de xenobióticos (Figura 7).

Figura 7 - Reação de hidrólise da acetilcolina

Em vertebrados, há dois tipos de colinesterases: acetilcolinesterase e butirilcolinesterases ou pseudocolinesterase, diferindo na especificidade com o substrato (HAREL et al., 1992; LETICIA; GERARDO, 2008). Em peixes, a acetilcolinesterase é predominante nos tecidos cerebrais e musculares, já a butirilcolinesterase está presente principalmente no fígado e plasma (HABIG; DIGIULIO, 1991). Há apenas um registro na literatura mostrando que um corante natural (eritrostominoma) é capaz de alterar a atividade da acetilcolinesterase em

embriões. Neste trabalho, o corante reduziu a atividade da enzima, culminando numa redução da atividade locomotora desse organismo (ABE et al., 2017c).

A metabolização dos xenobióticos envolve reações de fase I e fase II com o intuito de facilitar a excreção dos compostos, aumentando a hidrossolubilidade. A fase I envolve reações de oxidação, redução e hidrólise e confere polaridade por expor ou inserir grupamentos amina, carboxila, hidroxila e sulfidril. Já as reações de fase II envolvem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação e conjugação com glutathione e aminoácidos, incorporando cofatores endógenos aos compostos resultantes da fase I (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2014).

A enzima glutathione-S-transferase está envolvida na biotransformação de compostos, catalisando a conjugação da glutathione com os xenobióticos, auxiliando na formação de produtos menos tóxicos e mais hidrossolúveis. A glutathione é formada por três aminoácidos: glicina, ácido glutâmico e cisteína. Ela previne as reações entre o contaminante e compostos neutrofílicos teciduais, como lipídeos, proteínas e DNA. A medida da atividade desta enzima é bastante empregada para avaliação de ambientes contaminados (HYNE; MAHER, 2003). É importante ressaltar que se os níveis de glutathione estiverem reduzidos no organismo pode ocorrer um aumento da toxicidade de substâncias que originam metabólitos reativos, como radicais livres, podendo ocasionar estresse oxidativo e peroxidação lipídica (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2014).

A peroxidação lipídica é um dos processos que mais contribui para perda da função celular em situações de estresse oxidativo, podendo causar o rompimento das membranas celulares, alterar a permeabilidade e causar desequilíbrio da energia celular (STOREY, 1996). Ácidos graxos poli-insaturados são susceptíveis à ação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Nestas situações, um radical pode retirar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos, formando um radical lipídico que poderá interagir com O_2 e formar um radical peroxil. Quando estas reações ocorrem em cascata, ocorre a oxidação das membranas (ESTERBAUER, 1974).

Ainda no intuito de proteger as células contra os danos causados pelas espécies reativas, os organismos possuem o sistema enzimático (SIES, 1993). A atividade destas enzimas também pode ser aumentada ou diminuída na presença de contaminantes. A catalase é uma heme proteína presente nos peroxissomos que tem importante papel na defesa das células contra espécies reativas de oxigênio, pois

atua contra a formação destas espécies, convertendo peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (HEBBEL, 1996; JEMEC et al. 2010).

Além dos indicadores enzimáticos, também é possível avaliar os efeitos dos contaminantes sobre o equilíbrio energético dos indivíduos, sendo que o metabolismo energético tem papel fundamental na sobrevivência e funcionamento dos organismos, bem como na sua capacidade de tolerância e adaptação ao estresse. Ao ser afetado, o organismo necessitará de uma energia adicional para se recuperar e manter suas atividades (SOKOLOVA et al., 2012).

A avaliação das reservas e do consumo de energia pode ser empregada para compreender os efeitos de longo prazo, pois os processos de desintoxicação, consumo e assimilação de alimento e alterações metabólicas podem modificar também a homeostase energética dos organismos, alterando a quantidade de proteínas, carboidratos, lipídeos e atividade do sistema de transporte de elétrons (GRAVATO et al. 2014; CAMPOS et al., 2017).

Fatores como deficiência de oxigênio, salinidade, temperatura, acidificação dos oceanos e poluição são conhecidos por alterarem o balanço energético das espécies (SOKOLOVA et al., 2012). A avaliação destes parâmetros energéticos pode auxiliar na previsão do desenvolvimento e crescimento dos organismos (RODRIGUES et al., 2017).

1.5.4 Ensaios de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

Uma substância pode ser definida como genotóxica quando é capaz de interagir com o DNA diretamente ou após ativação metabólica, causando danos na estrutura e/ou função da molécula de DNA (WEISBURGER, 1999). Quando ocorre um dano no material genético, a célula interrompe seu ciclo celular e tenta se recuperar da lesão por meio do sistema de reparo. Se houver sucesso no reparo, o ciclo celular prossegue. Porém, se houver falhas, a célula pode ser conduzida à senescência, apoptose ou mutação, que pode resultar em carcinogênese (HOUTGRAAF; VERSMISSSEN; GIESSEN, 2006).

A mutação é uma alteração no material genético, que pode ocorrer em células somáticas ou germinativas, transmitida para as células-filhas ou para a prole, respectivamente, podendo ocorrer de forma espontânea ou induzida por mutágenos (MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008; BENIGNI; BOSSA, 2011). Ela ocorre em todos os seres vivos, sendo um importante fator no processo de evolução e

diversidade das espécies. Contudo, os agentes mutagênicos são capazes de acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que podem acarretar efeitos deletérios (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

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

O ensaio de mutagenicidade empregando *Salmonella typhimurium*, também conhecido como teste de Ames ou teste *Salmonella*/microsoma, é capaz de detectar mutações gênicas. É mundialmente utilizado para determinação do potencial mutagênico de novas drogas e substâncias químicas, devido à sua rápida resposta (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), sendo também bastante empregado para análise de amostras ambientais (ar, água, solos e sedimentos) e resíduos (JARVIS et al., 1996). Além da curta duração, o ensaio possui alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (60,3% dos casos), de acordo com o último estudo realizado pelo *National Toxicology Program* para 541 compostos (KIRKLAND et al., 2005).

As linhagens de *Salmonella* utilizadas no teste de Ames pertencem ao grupo de Enterobactérias capazes de produzir azo e nitroredutases (UMBUZEIRO et al., 2005). Cada linhagem apresenta sensibilidade específica para diferentes classes de mutágenos. Desse modo, a combinação delas permite identificar diversos agentes que podem interagir com o DNA (BENIGNI; BOSSA, 2011). As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para a triagem de amostras e são capazes de detectar compostos que causam deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de base, respectivamente. A combinação destas linhagens na presença e ausência de sistema exógeno de metabolização é capaz de detectar 90% dos mutágenos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). As características genéticas destas linhagens estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas nos ensaios de mutagenicidade deste projeto de pesquisa

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	hisD3052 ¹ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵	Deslocamento do quadro de leitura	Maron e Ames (1983)
TA100	hisG46 ¹ ; rfa ² ; Δbio ³ ; ΔuvrB ⁴ ; pkm101 (Ap ^r) ⁵	Substituição de pares de base	Maron e Ames (1983)

¹ mutação responsável pela síntese de histidina

² permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

³ dependência à biotina

⁴ deleção do gene uvrB

⁵ resistência a ampicilina

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

2 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os três corantes dispersos avaliados são capazes de causar efeitos deletérios nos organismos expostos em diferentes níveis de organização biológica. No entanto, os azo corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78 foram mais tóxicos para os organismos *Vibrio fischeri* e *Daphnia similis*, assim como alteraram maior número de *endpoints* em embriões e larvas de *Danio rerio*, incluindo biomarcadores bioquímicos e de energia, comportamento e desenvolvimento. Adicionalmente, estes dois corantes induziram mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*.

As alterações nos organismos expostos foram observadas a partir da concentração de 1 µg/L, atividade da enzima catalase em embriões de *Danio rerio* expostos ao corante Disperse Red 73. Dessa forma, este corante foi identificado pelo seu potencial em causar efeito na menor concentração comparado aos outros corantes.

Apesar do corante Disperse Red 60 alterar menor número de parâmetros avaliados, devemos ressaltar que este corante já foi encontrado em efluentes no Brasil, aumentando a preocupação com esta substância.

Dessa forma, considerando os objetivos específicos, podemos concluir que:

- 1) Os corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78 causam toxicidade aguda em *Vibrio fischeri* e *Daphnia similis*;
- 2) Os corantes Disperse Red 60 e Disperse Red 73 causam alterações no desenvolvimento de embriões e larvas de *Danio rerio*, assim como os três corantes induzem alterações comportamentais e bioquímicas nestes organismos e
- 3) Os corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78 induzem mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. R. et al. Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. **Chemosphere**, v. 178, p. 282-290, 2017a.
- ABE, F. R. et al. Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80 (23-24), p. 1259-1268, 2017b.
- ABE, F. R. et al. Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 255-262, 2017c.
- ABRAMENKOA, N. B. et al. Ecotoxicity of different-shaped silver nanoparticles: Case of zebrafish embryos. **Journal of Hazardous Materials**, v. 347, p. 89–94, 2018.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2006. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp8-c3.pdf>>. Acesso em: 30 de agosto de 2015.
- AL-SABTI, K. Chlorotriazine reactive Azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v. 47, p. 149-155, 2000.
- ALVES, D.S et al. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. **Biochemical Pharmacology**. v. 68, p. 549-561, 2004.
- ANASTASI, A. et al. Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes. **New Biotechnology**, v. 29, p. 38-45, 2011.
- ANDRADE, T. S. et al. Carbendazin exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v.170, p. 390-399, 2016.
- 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.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM). Disponível em: <http://abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp>. Acesso em: 30 de agosto de 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). Disponível em: <<http://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 31 de outubro de 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3**: Ecotoxicologia aquática-Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2012. 23 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:2006**. Ecotoxicologia aquática- Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016. 23 p

AZUR ENVIRONMENTAL, 1998. Microtox Acute Toxicity Test. Disponível em: <http://www.coastalbio.com/images/Acute_Overview.pdf>. Acesso em 08 de outubro de 2016.

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

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

BAKER, M. A.; CERNIGLIA, G. J.; ZAMAN, A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 190, p. 360–365, 1990.

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

BAZIN, I. et al. Estrogenic and anti-estrogenic activity of 23 commercial textile dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 85, p. 131-136, 2012.

BELANGER, S. E.; BALON, E. K.; RAWLINGS, J. M. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 88–95, 2010.

BELPAIRE, C. et al. Toxic textile dyes accumulate in wild European eel *Anguilla Anguilla*. **Chemosphere**, v. 138, p. 784–791, 2015.

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

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

BILOTTA, J.; SASZIK, S. The zebrafish as a model visual system. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 19, p. 621-629, 2001.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malonyldialdehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, p.105–110, 1984.

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

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

BOURRACHOT, S.; SIMON, O.; GILBIN, R. The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 29-36, 2008.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analysis Biochemical**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAUNBECK, T. et al. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *Altex*, v. 22, p.87-100, 2005.

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

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

BURGESS, H. A.; GRANATO, M. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 2526-2539, 2007.

CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Inorganics and hormesis. **Critical Reviews in Toxicology** v. 33, p. 215–304, 2003.

CAMPOS, D. et al. Ecotoxicity of two organic UV-filters to the freshwater caddisfly *Sericostoma vittatum*. **Environmental Pollution**, v. 228, p. 370-377, 2017.

CARLIELL, C. M. et al. The Effect of Salts Used in Textile Dyeing on Microbial Decolourisation of a Reactive Azo Dye. **Journal Environmental Technology**, v. 19, p. 1133-1137, 1998.

CARMEN, Z.; DANIELA, S. Textile organic dyes - Characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents - A critical overview. In: **Organic pollutants ten years after the Stockholm Convention-Environmental and analytical update**, ed. T. Puzyn and A. Mostrag-Szlichtyng, p. 55–86, 2012. InTech-Open Access Company. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/organic-pollutants-ten-years-after-the-stockholm-convention-environmental-and-analytical-update/textile-organic-dyes-characteristics-polluting-effects-and-separation-elimination-procedures-from-in>>. Acesso em: 01 de setembro de 2017.

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

CHAMBERS, J. E. et al. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 8, p. 165–176, 2002.

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

CHAUDHARI, A. U. et al. Effective biotransformation and detoxification of anthraquinone dye reactive blue 4 by using aerobic bacterial granules, v. 122, p. 603-613, 2017.

CHENG, S. H. et al. Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 19, p. 3024–3031, 2000.

CHEQUER, F. M. D. et al. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research**, v.676, p.83–86, 2009.

CHHETRI, J.; JACOBSON, G.; GUEVEN, N. Zebrafish-on the move towards ophthalmological research. **Eye**, v. 28, p. 367-380, 2014.

CHI, W. C., CHEN, C. H., LIU, S. M. Biodegradation of anthraquinone dyes by *Shewanella* sp. NTOU1 under anaerobic conditions. *Water Science and Technology*, v. 60, p. 889-899, 2009.

CHOI, J.; ROCHE, H.; CAQUET, T. Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassiumdichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg.(Diptera: Chironomidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology, Pharmacology**, v.130, p. 11–17, 2001.

CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In **CRC handbook of methods in oxygen radical research**, Ed. R. A. Greenwald, p. 283–284. Boca Raton: CRC Press, 1985.

CLAXTON, L. D. et al. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. Without exogenous activation. **Mutation Research**, v. 253, p. 137-147, 1991a.

CLAXTON, L. D. et al. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: II. With exogenous activation. **Mutation Research**, v. 253, p. 149-159, 1991b.

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

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

CROCE, R. et al. Aquatic toxicity of several textile dye formulations: Acute and chronic assays with *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 79–87, 2017.

CZESNY, S. J.; GRAEB, B. D.S.; DETTMERS, J. M. Ecological consequences of swim bladder noninflation for larval yellow perch. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 134, p. 1011–1020, 2005.

DARSANA, R. et al. Acute toxicity assessment of reactive red 120 to certain aquatic organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, p.582–587, 2015.

DE COEN, W.M.; JANSSEN, C.R. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 43-55, 1997.

DE COEN, W., JANSSEN, C. R. The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 22, 1632–1641, 2003.

DIAMANTE, G. et al. Developmental toxicity of hydroxylated chrysene metabolites in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v.189, p. 77–86, 2017.

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

DOYOTTE, A. et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**, v. 9, pp. 93-110, 1997.

EEC/2010. Official Journal of the European Union. Council Directive 2010/63/EU of the European parliament and the council of 22 September 2010. Disponível em: < <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN> > Acesso em 02 Jan. 2018.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** v.7, p. 88-90, 1961.

ESTERBAUER, H. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: **Free Radicals in Liver Injury** (Poli G.; Cheeseman K. H.; Dianzani, M. U.; Slater, T. F. eds). Oxford: IRL Press, p. 29-47, 1984.

FARRÉ, M. L. et al. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. **Journal of Chromatography**, v. 14, p. 187-197, 2001.

FERNANDES, F. H.; BUSTOS-OBREGON, E.; SALVADORI, D. M. Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. **Reproductive Toxicology**, v. 53, p. 75-81, 2015.

FERREIRA, N. G. C et al. Long-term exposure of the isopod *Porcellionides pruinosus* to nickel: Costs in the energy budget and detoxification enzymes. **Chemosphere**, v. 135, p. 354–362, 2015.

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

FERRAZ, E. R. A. et al. Photoelectrocatalysis based on Ti/TiO₂ nanotubes removes toxic properties of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1 from aqueous chloride samples. **Journal of Environmental Management**, v. 124, p. 108-114, 2013.

FERRAZ, E. R.; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 628-633, 2011.

FILHO, W. D. et al. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture**, v. 203, p. 149-158, 2001.

FINNEY, J. L. et al. Structure and autonomic innervation of the swim bladder in the zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 495, p. 587-606, 2006.

FRANCO, J. H. et al. Identification of biotransformation products of disperse dyes with rat liver microsomes by LC-MS/MS and theoretical studies with DNA: Structure-mutagenicity relationship using Salmonella/microsome assay. **Science of the Total Environment** v. 613–614, p. 1093–1103, 2018.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 26, p. 149-156, 2002.

FRAHER, D. et al. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. **Cell Reports**, v. 14, p. 1317-1329, 2016.

GESTRI, G.; LINK, B. A.; NEUHAUSS, S. C. F. The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. **Developmental Neurobiology**, v. 72, p. 302-327, 2012.

GIROTTI, S. et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, p. 02-29, 2008.

GHALY, A. E. et al. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. **Journal of Chemical Engineering and Process Technology**, v. 5 (1), p. 1–19, 2014.

GLASS, A. S.; DAHM, R. The zebrafish as a model organism for eye development. **Ophthalmic Research**, v. 36, p. 4-24, 2004.

GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS (GHS), 2007. **Part 4: Environmental Hazards**. Disponível em: <http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/English/04e_part4.pdf>. Acesso em: 30 de agosto de 2017.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Current Opin Pharmacology**, v. 4, p.504-512, 2004.

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

GOLOB, V.; TUSĚK, L. VIS absorption spectrophotometry of disperse dyes. **Dyes and Pigments**, v. 40, n. 2/3, p. 211-217, 1999.

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

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

GRAVATO, C. et al. Using a multibiomarker approach and behavioural responses to assess the effects of anthracene in *Palaemon serratus*. **Aquatic Toxicology**, v.149, p. 94–102, 2014.

GRAY, L. E. Jr. et al. Gonadal effects of fetal exposure to the azo dye congo red in mice: infertility in female but not male offspring. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 19, p. 411-422, 1992.

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

GUILHERMINO, L. et al. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 357-362, 2000.

GUILHERMINO, L.; LOPES, M. C.; CARVALHO, A. M. V. M. Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* Straus. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 979-985, 1996.

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

HABIG, C.; DI GIULIO, R.T. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: **Cholinesterase-Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment**, edited by P. Mineau. Elsevier, N.Y. p. 19-33, 1991.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases e first enzymatic step on mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p. 7130-7139, 1974.

HAGENAARS, A. et al. PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 157, p. 225-235, 2014.

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

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

HALLARE, A. V. et al. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, p. 07–17, 2005.

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

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

HAREL, M. et al. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89 (22), p. 10827–10831, 1992.

HE, J. H. et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 42, p. 35-42, 2014.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, V. 107, p. 401-404, 1986.

HENRIQUES, J. F. et al. Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. **Aquatic Toxicology**, 170, p. 355-364, 2016.

HERBOMEL, P.; THISSE, B.; THISSE, C. Ontogeny and behavior of early macrophages in the zebrafish embryo. **Development**, v. 126, p. 3735-3745, 1999.

HERNÁNDEZ-ZAMORA, M. et al. Congo red dye affects survival and reproduction in the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Effects of direct and dietary exposure. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 1832–1840, 2016.

HOLKAR, C. R; PANDIT, A. B.; PINJARI, D. V. Kinetics of biological decolorisation of anthraquinone based Reactive Blue 19 using an isolated strain of *Enterobacter* sp.F NCIM 5545. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 342–351, 2014.

HOUTGRAAF, J. H.; VERMISSENA, J.; GIESSEN, W. J. V. D. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v.7, p.165-172, 2006.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498-503, 2013.

HUANG, L. et al. Use of toxicogenomics to predict the potential toxic effect of benzo(a)pyrene on zebrafish embryos: ocular developmental toxicity. **Chemosphere**, v. 108, p. 55-61, 2014.

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v. 54, p. 366–374, 2003.

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

IRONS, T.D. et al. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 84–90, 2010.

KOH, J. Dyeing with disperse dyes. In: **Textile dyeing**, P. Hauser (Ed.), p. 195-220, 2011. InTech—Open Access Company. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/25012.pdf>>. Acesso em 01 de setembro de 2017.

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

JÄGER, I.; HAFNER, C.; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, v. 561, p. 35-44, 2004.

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

JEMEC, A et al. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione-S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. **Environmental Science Pollution**, v. 17, p. 571–581, 2010.

JOSEPHY, P. D. et al. Potent Mutagenicity in the Ames Test of 2-Cyano-4-Nitroaniline and 2,6-Dicyano-4-Nitroaniline, Components of Disperse Dyes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 57, p. 10-16, 2016.

KANT, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. **Natural Science**, v. 4 (1), p. 22-26, 2012.

KHANGAROT, B. S.; RAY, P. K.;CHANDRA, H. *Daphnia magna* as a model to assess heavy metal toxicity: comparative assessment with mouse system. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 15, p. 427-432, 1987.

KIM, K. et al. Combined toxicity of endosulfan and phenanthrene mixtures and induced molecular changes in adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 194, p. 30-41, 2018.

KIMMEL, C.B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.203, p.253-310, 1995.

KIRKLAND, D. et al. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutation Research**, v. 584, p. 1-256, 2005.

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

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1-20, 2007.

LEME, D. M. et al. Eco- and geno-toxicological assessments of two reactive textile dyes. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 78, p. 287-300, 2015.

LETICIA, A. G.; GERARDO, G. B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 787–797, 2008.

LEVINE, W. G. Studies on microsomal azoreduction N, N-dimethyl-4-aminoazobenzene (DAB) and its derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 3259–3264, 1985.

LI, Y. et al. Toxicity assessment on three direct dyes (D-BLL, D-GLN, D-3RNL) using oxidative stress bioassay and quantum parameter calculation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p. 132–140, 2012.

LI, K. et al. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40-48, 2017.

LI, M. et al. Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cardiac development in zebrafish. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 7973-7983, 2014.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 353-367, 2007.

LIN, W. et al. The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 197-206, 2018.

LINDSEY, B. W.; SMITH, F. M.; CROLL, R. P. From inflation to flotation: contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 7, p. 85-96, 2010.

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

LIU, H et al. Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*). **Chemosphere**, v. 66, p. 2159-2165, 2007.

LIU, H. et al. In vivo cardiovascular toxicity induced by acetochlor in zebrafish Larvae. **Chemosphere**, v. 181, p. 600-608, 2017.

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

MAAS, R.; CHAUDHARI, S. Adsorption and biological decolourization of azo dye Reactive Red 2 in semicontinuous anaerobic reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 699-705, 2005.

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

MACPHAIL, R. C. et al. Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology**, v. 30, p. 52-58, 2009.

MAGUIRE, R. J.; TKACZ, R. J. Occurrence of dyes in the Yamaska River, Quebec. **Water Pollution Research Journal of Canada**. v. 26 (2), p. 145–161, 1991.

MALINAUSKIENE, L. et al. Contact allergy from disperse dyes in textiles—a review. **Contact Dermatitis**, v. 68 (2), p. 65-75, 2012.

MANSOUR, H. B. 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, p.1670-1677, 2007.

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

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

MATHIEU-DENONCOURT, J. et al. Sediment contaminated with the azo dye Disperse Yellow 7 alters cellular stress- and androgen-related transcription in *Silurana tropicalis* larvae. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 2952-2961, 2014.

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

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

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

MOST, M. et al. A mixture of environmental organic contaminants in lake sediments affects hatching from *Daphnia* resting eggs. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 34, p. 338-345, 2015.

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, p. 38-48, 2002.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Disperse Blue 1**. National Toxicology Program, 2011. Disponível em <<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/disperseblue1.pdf>>. Acesso em 30 de agosto de 2017.

NOVAIS, S.C.; AMORIM, M.J. Changes in cellular energy allocation in *Enchytraeus albidus* when exposed to dimethoate, atrazine, and carbendazim. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, p. 2800-2807, 2013.

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

O'NEILL, C. et al. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 1009-1018, 1999.

OGA, S.; FARSKY, S. H.; MARCOURAKIS, T. Toxicocinética. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. Editora Atheneu, São Paulo, p. 7-20, 2014.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLLGAARD, H. et al. **Survey of azo colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects**. Ministry of Environment and Energy, Denmark, 1998.

OLIVEIRA, G. A. et al. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 429-434, 2016.

OLIVEIRA, R. et al. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, p. 679-688, 2009.

OLSEN, T et al. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1725–1732, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2013. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (Guideline 236).

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2004. *Daphnia* sp. Acute immobilisation Test (Guideline 202).

OROPESA, A. L. et al. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to effluents spiked with emerging contaminants under ozonation and advanced oxidation processes. **Environmental Science Pollution Research**, v. 24, p. 1735-1747, 2017.

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

PARROTT, J. L.; BARTLETT, A. J.; BALAKRISHNAN, V. K. Chronic toxicity of azo and anthracenedione dyes to embryo-larval fathead minnow. **Environmental Pollution**, v. 210, p. 40-47, 2016.

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

PIOLATTO, G. et al. Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: an updated analysis. **British Journal of Cancer**, v. 63(3), p. 457–459, 1991.

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

PRZYSTAS, W.; ZABLOCKA-GODLEWSKA, E.; GRABINSKA-SOTA, E. Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. **Brazil Journal of Microbiology**, v. 46, p. 415-424, 2015.

PUVANESWARI, N.; MUTHUKRISHNAN, J.; GUNASEKARAN, P. Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44 (8), p. 618-626, 2006.

QUAIFE, N.M.; WATSON, O.; CHICO, T. J. Zebrafish: an emerging model of vascular development and remodelling. **Current Opinion on Pharmacology**, v. 12, p. 608–614, 2012.

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

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, S. L. Introduction to aquatic toxicology. In.: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application**. London, Hemisphere Publishing Corporation, p. 01-69, 1995.

RAWAT. D. et al. Ecotoxic potential of a presumably non-toxic azo dye. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 528-537, 2017.

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

ROBERTSON, G. N. et al. Development of the swimbladder and its innervation in the zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Morphology**, v. 268, p. 967-985, 2007.

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

ROCHA, O. P. et al. Ecotoxicological risk assessment of the “Acid Black 210” dye. **Toxicology**, v. 376, p. 113-119, 2017.

RODRIGUES, A. C. et al. Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 371-376, 2016.

RODRIGUES, A. C. M. et al. Energetic costs and biochemical biomarkers associated with esfenvalerate exposure in *Sericoxystoma vittatum*. **Chemosphere**, v. 189, p. 445-453, 2017.

RODRIGUES, A.C. M. et al. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 508, p.506–513, 2015.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. 238 pp. London: Methuen, 1959.

SAFARIKOVÁ, M. et al. Biosorption of water-soluble dyes on magnetically modified *Saccharomyces cerevisiae* subsp. Uvarum cells. **Chemosphere**, v. 59, p. 831–835, 2005.

SANTORIELLO, C.; ZON, L. I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 2337-2343, 2012.

SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2369-2385, 2007.

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

SCHOLZ, S. Zebrafish embryos as an alternative model for screening of druginduced organ toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 87, p.767-769, 2013.

SEN, C.K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 660-672, 1997.

SHEN, B. et al. Toxicity induced by Basic Violet 14, Direct Red 28 and Acid Red 26 in zebrafish larvae. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35(12), p.1473-80, 2015.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SMITH, G.; KANAWA, R. T. Some traditional colourants of maori and other cultures. **Chemistry in New Zealand**, v. 72, p. 127-131, 2008.

SMOLDERS, R.; DE BOECK, G.; BLUST, R.Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 890–899, 2003.

SOKOLOVA, I. M. et al. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 1-15, 2012.

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

SPENCE, R. et al. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 89, p. 13-24, 2008.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29 (12), p. 1715-1733, 1996.

STRAHLE, U. et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments - a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, p. 128-132, 2012.

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

TEHRANI-BAGHA, A.; HOLMBERG, K. Solubilization of Hydrophobic Dyes in Surfactant Solutions. **Materials (Basel)**, v. 6, p. 580–608, 2013.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. **Analytical Biochemistry**, v. 27, p. 502-522, 1969.

THISSE, C., ZON, L. Organogenesis-heart and blood formation from the zebrafish point of view. **Science**, v. 295, p. 457-462, 2002.

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

TORRES, M. A. et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44 (9), p. 923-932, 2002.

TSUBOY, M. S. et al. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1650-1655, 2007.

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

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

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.

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

VACCHI, F. I. et al. Occurrence and risk assessment of an azo dye e the case of Disperse Red 1. **Chemosphere**, v. 156, p. 95-100, 2016.

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

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, v.28, p. 711-717, 2003.

VENTURA-CAMARHO, B. C.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-332, 2016.

VERSLYCKE, T. et al. Cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following tributyltin exposure. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 288, p. 167-179, 2003.

VILLENEUVE, D. et al. Investigating alternatives to the fish early-life stage test: a strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways for early fish development. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 158-169, 2014.

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

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

WANG, Y. P. et al. Effects of embryonic exposure to polychlorinated biphenyls on zebrafish (*Danio rerio*) retinal development. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p. 186-193, 2012.

WANG, X. H. et al. Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylum herbicide diquat. **Toxicology Letters**, v. 283, p. 13–20, 2018.

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

WEISBURGER, J.H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. **Mutation Research**, v. 506–507, p. 9–20, 2002.

WINATA, C. L. et al. Development of zebrafish swimbladder: The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. **Developmental Biology**, v. 331, p. 222-236, 2009.

WORLD DYES & ORGANIC PIGMENTS. Disponível em: <<http://www.prnewswire.com/news-releases/world-dyes-organic-pigments-market-300113681.html>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2018.

XU, C., ZON, L. I. The zebrafish as a model for human disease. In: Perry, S.F., EKKE R, M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.), **Fish Physiology**. Academic Press, p. 345-365, 2010.

YU, T. H. et al., CYP-dependent induction of glutathione S-transferase in *Daphnia similis* exposed to a disperse azo dye. **Ecotoxicology**, v. 24, p. 232-237, 2015.

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

ZHANG, W. et al. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, p. 2019-2027, 2012.

ZHANG, S. et al. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 181, p. 270-280, 2017.

ZHENG, W. et al. Comparative transcriptome analyses indicate molecular homology of zebrafish swimbladder and mammalian lung. **PLoS One**, v. 6, p. 1-13, 2011.

ZHOU, R. et al. The developmental toxicity and apoptosis in zebrafish eyes induced by carbon-ion irradiation. **Life Sciences**, v. 139, p. 114-122, 2015.

ZHOU, Y.; DU, Z.; ZHANG, Y. Simultaneous determination of 17 disperse dyes in textile by ultra-high performance supercritical fluid chromatography combined with tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 127, p. 108-115, 2013.

ZOCOLO, G. J. et al. Using SPE-LC-ESI-MS/MS Analysis to Assess Disperse Dyes in Environmental Water Samples. **Journal of Chromatographic Science**, v.53, p. 1257–1264, 2015.

ZOU, P. et al. A conserved role of α A-crystallin in the development of the zebrafish embryonic lens. **Experimental Eye Research**, v. 138, p. 104-113, 2015.