**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, Lívia, 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, Nayarah, 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 ecogenotoxicológico 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.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características e estruturas moleculares dos corantes têxteis avaliados. ..8

Figura 2 - Representação do ensaio de inibição da luminescência de *Vibrio fischeri*10

Figura 3 - Exemplar de *Daphnia similis* .....11

Figura 4 - Exemplares de *Danio rerio*.....12

Figura 5 - Estágios de desenvolvimento de *Danio rerio* .....13

Figura 6 - Larvas de *Danio rerio* com 144 horas pós fertilização em placas de cultura .....16

Figura 7 - Reação de hidrólise da acetilcolina.....17

Figura 8 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao sulfato de zinco (controle positivo).....34

Figura 9 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Disperse Red 60 .....36

Figura 10 - Comparação entre um organismo não exposto ao corante Disperse Red 60 (esquerda) e exposto à 4 mg/L do corante Disperse Red 60 (direita) por 144 horas. As setas indicam o aspecto de desenvolvimento dos olhos, sendo que a seta preta aponta para o desenvolvimento normal dos olhos e a seta vermelha aponta para o edema ocular. (Amplificação de 4X nas fotografias superiores e 3X nas fotografias inferiores).....38

Figura 11 - Distância total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 60 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle .....39

Figura 12 - Tempo total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 60 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle .....39

Figura 13 - Atividade das enzimas glutationa S-transferase (esquerda) e catalase (direita) em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....40

Figura 14 - Níveis de glutationa total em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....40

Figura 15 - Níveis de peroxidação lipídica em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....41

Figura 16 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....41

Figura 17 - Energia consumida (esquerda) e alocação de enrgia celular (direita) em larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 60. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....42

Figura 18 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Disperse Red 73 .....43

Figura 19 - Comparação entre um organismo não exposto (esquerda) e exposto à 4 mg/L do corante Disperse Red 73 (direita) por 72 horas. As setas apontam o coração, sendo que a seta preta aponta para o desenvolvimento normal do coração e a seta vermelha indica edema cardíaco. (Amplificação 3X) .....47

Figura 20 - Comparação entre um organismo não exposto (esquerda) e exposto à 4 mg/L do corante Disperse Red 73 (direita) por 144 horas. As setas pretas apontam o coração, as setas vermelhas apontam o saco vitelínico, a seta roxa aponta a localização da bexiga natatória e a seta verde aponta para a coluna vertebral (Amplificação 3X) .....47

Figura 21 - Distância total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 73 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle .....48

Figura 22 - Tempo total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 73 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05.....48

Figura 23 - Atividade das enzimas glutationa S-transferase (esquerda) e catalase (direita) em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....49

Figura 24 - Níveis de glutationa total em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....49

Figura 25 - Níveis de peroxidação lipídica em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....50

Figura 26 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....50

Figura 27 - Energia consumida (esquerda) e alocação de enrgia celular (direita) em larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 73. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....51

Figura 28 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Disperse Red 78 .....54

Figura 29 - Comparação entre um organismo não exposto ao corante Disperse red 78 (esquerda) e exposto à 5 mg/L do corante Disperse Red 78 (direita) por 24 e 144 horas. (Amplificação de 4X nas fotografias superiores e 3X nas fotografias inferiores) .....56

Figura 30 - Distância total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 78 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle .....57

Figura 31 - Tempo total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 78 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle .....57

Figura 32 - Atividade das enzimas glutationa S-transferase (esquerda) e catalase (direita) em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....58

Figura 33 - Níveis de Glutationa Total em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....58

Figura 34 - Níveis de peroxidação lipídica em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....59

Figura 35 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....59

Figura 36 - Energia consumida (esquerda) e alocação de enrgia celular (direita) em larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 73. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....60

Figura 37 - Comparação entre o olho humano e o olho de *zebrafish*.....65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Toxicidade de corantes a embriões e larvas de *Danio rerio* publicados em periódicos até dezembro de 2017 .....15

Tabela 2 - Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas nos ensaios de mutagenicidade deste projeto de pesquisa .....21

Tabela 3 - Valores obtidos nos ensaios de sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de potássio em meio ASTM, realizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA).....35

Tabela 4 - Valores obtidos nos ensaios de sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de potássio em meio MS realizado na Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).....35

Tabela 5 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 60 por 48 horas em meio ASTM e meio MS.....37

Tabela 6 - Valores calculados de CENO e CEO para o corante Disperse Red 60....37

Tabela 7 - Frações de energia disponível e energia disponível total de larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Diserse Red 60. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....42

Tabela 8 - Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 60 empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 .....43

Tabela 9 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 73 por 48 horas em meio ASTM e valor de $CE_{50}$ com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber.....45

Tabela 10 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 73 por 48 horas em meio MS e valor de CE50 com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber.....45

Tabela 11 - Valores calculados de CENO e CEO para o corante Disperse Red 60 e Disperse Red 73.....46

Tabela 12 - Frações de energia disponível e energia disponível total de larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 73. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05 .....51

Tabela 13 - Avaliação da mutagenicidade dos corantes Disperse Red 73 comercial e Disperse Red 73 purificado empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 .....53

Tabela 14 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 78 por 48 horas em meio ASTM e valor de $CE_{50}$ com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber.....55

Tabela 15 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 78 por 48 horas em meio MS e valor de $CE_{50}$ com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber.....55

Tabela 16 - Frações de energia disponível e energia disponível total de larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 78. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett $p<0,05$ .....60

Tabela 17 – Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 78 empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 .....61

Tabela 18 - Síntese dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com os corantes dispersos neste trabalho.....63

**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 Ensaios de toxicidade ..... 9

1.5.1 Ensaio de inibição da luminescência com *Vibrio fischeri* ..... 9

1.5.2 Ensaio com microcrustáceos zooplanctônicos ..... 10

1.5.3 Ensaios com *Danio rerio (zebrafish)* ..... 11

1.5.3.1 Teste de embriotoxicidade (FET) ..... 12

1.5.3.2 Ensaios de comportamento ..... 16

1.5.3.3 Ensaio com biomarcadores bioquímicos ..... 16

1.5.4 Ensaios de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* ..... 19

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS DA PESQUISA ..... 22

2.1 Hipótese ..... 22

2.2 Objetivo Geral ..... 22

2.3 Objetivos Específicos ..... 22

3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 23

3.1 Corantes estudados ..... 23

3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* ..... 23

3.3 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* ..... 24

3.4 Ensaios de embriotoxicidade com *Danio rerio* ..... 26

3.5 Avaliação do comportamento de larvas expostas aos corantes dispersos ..... 27

3.6 Avaliação dos biomarcadores enzimáticos e reservas energéticas em *zebrafish* expostos aos corantes ..... 28

3.6.1 Determinação de lipídeos .....29
3.6.2 Determinação de carboidratos e proteínas totais .....29
3.6.3 Determinação da atividade do sistema transportador de elétrons .....30
3.6.4 Avaliação da alocação da energia celular.....30
3.6.5 Determinação da peroxidação lipídica.....31
3.6.6 Determinação da Glutationa Total (GT).....31
3.6.7 Determinação da atividade da glutationa S-transferase (GST).....31
3.6.8 Determinação da atividade da catalase (CAT) .....31
3.6.9 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) .....31
3.6.10 Quantificação de proteínas.....32
3.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* .....32
4. RESULTADOS.....34
4.1 Ensaios de sensibilidade com os organismos-teste.....34
4.2 Disperse Red 60.....36
4.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*.....36
4.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*.....36
4.2.3 Ensaios de embriotoxicidade com *Danio rerio*.....37
4.2.4 Avaliação do comportamento de larvas de *Danio rerio*.....38
4.2.5 Biomarcadores bioquímicos.....40
4.2.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxificação.....40
4.2.5.2 Níveis de antioxidante não enzimático .....40
4.2.5.3 Peroxidação lipídica .....41
4.2.5.4 Acetilcolinesterase .....41
4.2.6 Reservas e consumo de energia .....41
4.2.6.1 Energia disponível.....41
4.2.6.2 Energia consumida e alocação de energia celular.....42
4.2.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*.....42

4.3 Disperse Red 73 ..... 43
4.3.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* ..... 43
4.3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* ..... 44
4.3.3 Ensaios com as formas iniciais do desenvolvimento de *Danio rerio* ..... 45
4.3.4 Avaliação do comportamento de larvas de *Danio rerio* ..... 47
4.3.5 Biomarcadores bioquímicos ..... 48
4.3.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxificação ..... 48
4.3.5.2 Níveis de antioxidante não enzimático ..... 49
4.3.5.3 Peroxidação lipídica ..... 49
4.3.5.4 Acetilcolinesterase ..... 50
4.3.6 Reservas e consumo de energia ..... 50
4.3.6.1 Energia disponível ..... 50
4.3.6.2 Energia consumida e alocação de energia celular ..... 51
4.3.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* ..... 51
4.4 Disperse Red 78 ..... 54
4.4.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* ..... 54
4.4.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* ..... 54
4.4.3 Ensaio com as formas iniciais de *Danio rerio* ..... 56
4.4.4 Avaliação do comportamento de larvas de *Danio rerio* ..... 56
4.4.5 Biomarcadores Bioquímicos ..... 58
4.4.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxificação ..... 58
4.4.5.2 Níveis de antioxidante não enzimático ..... 58
4.4.5.3 Peroxidação lipídica ..... 59
4.4.5.4 Acetilcolinesterase ..... 59
4.4.6 Reservas e consumo de energia ..... 59
4.4.6.1 Energia disponível ..... 59
4.4.6.2 Energia consumida e alocação de energia celular ..... 60

4.4.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* ..... 61

5. DISCUSSÃO ..... 62

6 CONCLUSÃO ..... 78

REFERÊNCIAS ..... 79

APÊNDICES ..... 100

ANEXOS ..... 104

# 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 continuadamente, 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 2° 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 ($CL_{50}$) 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 ($CL_{50}$: 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 baniu 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; ZOCOLO 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.

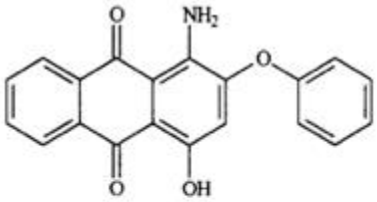
**Disperse Red 60**

Fórmula molecular: $C_{20}H_{13}NO_4$

Peso molecular: 331,32 g/mol

Pureza: 60-80%

Empresa: Huntsman Textile Effects



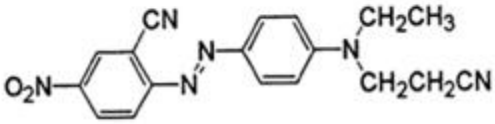

**Disperse Red 73**

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

Peso molecular: 348,46 g/mol

Pureza: 60-80%

Empresa: Classic Dyestuff, Inc (EUA)



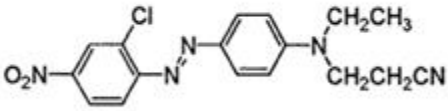

**Disperse Red 78**

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 minizam 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)

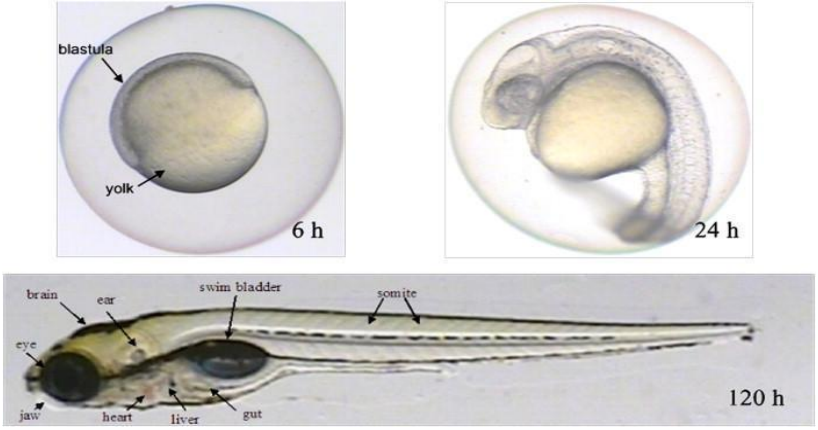
*Zebrafish* tem sido o principal modelo para estudar os processos de desenvolvimento em vertebrados devido ao rápido desenvolvimento embrionário, transparência dos embriões, tamanho pequeno, facilidade de manutenção em

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 at al. (2017a); Abe et al. (2017b) Abe et al (2017c) |
| Eritrostominoma | 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 at al. (2017a); Abe et al. (2017b) Abe et al (2017c) |

GST: glutationa S-transferase
CAT: catalase
GT: glutationa total
EC: energia consumida
AEC: alocação de energia celular
AChE: acetilcolinesterase

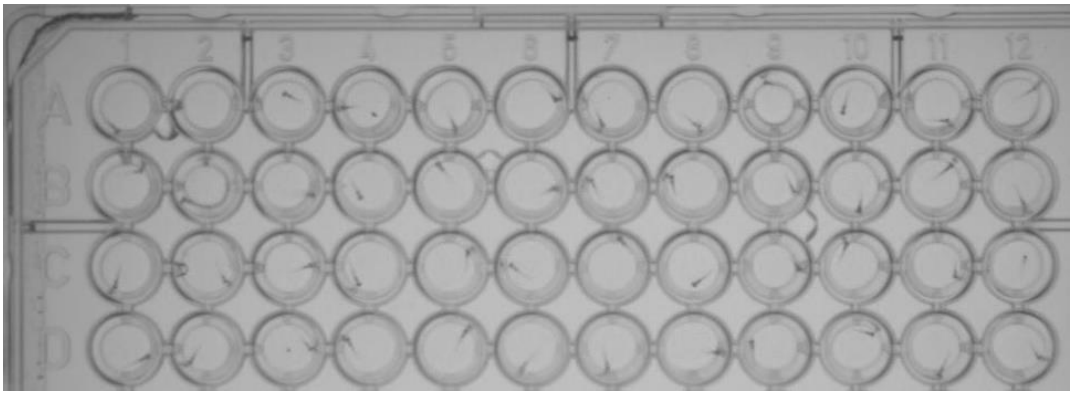
#### 1.5.3.2 Ensaios de comportamento

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

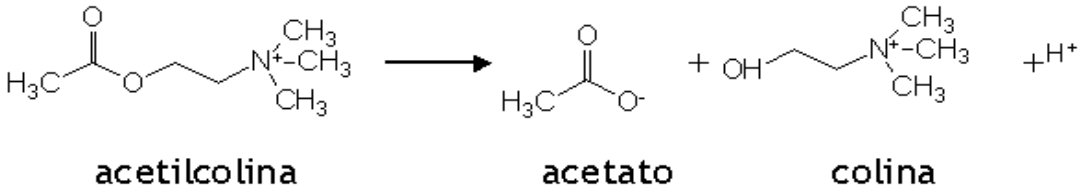
Um marcador bioquímico pode ser definido como um parâmetro biológico que se altera como resposta à exposição a determinados toxicantes, indicando uma

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 sulfidrila. Já as reações de fase II envolvem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação e conjugação com glutationa e aminoácidos, incorporando cofatores endógenos aos compostos resultantes da fase I (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2014).

A enzima glutationa-S-transferase está envolvida na biotransformação de compostos, catalisando a conjugação da glutationa com os xenobióticos, auxiliando na formação de produtos menos tóxicos e mais hidrossolúveis. A glutationa 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 glutationa 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 hemeproteína 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, lipideos 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; VERSMISSEN; 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*/microssoma, 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. HIPÓTESE E OBJETIVOS DA PESQUISA

## 2.1 Hipótese

Diante do potencial dos corantes dispersos causarem toxicidade em diferentes organismos, assim como das características dos corantes estudados, a hipótese desta pesquisa foi de que os corantes Disperse Red 60, Disperse Red 73 e Disperse Red 78 causam alterações na sobrevivência, desenvolvimento, comportamento, biomarcadores bioquímicos e material genético, afetando os organismos em diferentes níveis de organização biológica.

## 2.2 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos e genotóxico causados pela exposição de organismos de diferentes níveis tróficos a três corantes dispersos, sendo 1 antraquinona e 2 azo, representados respectivamente por Disperse Red 60, Disperse Red 73 e Disperse Red 78.

## 2.3 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

a) Avaliação da toxicidade aguda dos corantes DR60, DR73 e DR78 por meio do ensaio de redução da bioluminescência de *Vibrio fischeri*;

b) Avaliação da ecotoxicidade dos corantes DR60, DR73 e DR78 empregando ensaios de toxicidade aguda com a espécie *Daphnia similis*;

c) Avaliação dos efeitos letais, subletais e teratogênicos dos corantes DR60, DR73 e DR78 sobre embriões e larvas de *Danio rerio;*

d) Avaliação do comportamento de larvas de *Danio rerio* expostas aos corantes DR60, DR73 e DR78;

e) Avaliação de alterações bioquímicas e energéticas em larvas de *Danio rerio* expostos aos corantes DR60, DR73 e DR78 e

f) Avaliação da mutagenicidade dos corantes DR60, DR73 e DR78 empregando o ensaio com *Salmonella typhimurium*.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 Corantes estudados

As concentrações dos corantes que foram utilizadas nos diferentes ensaios de toxicidade foram determinadas com base na solubilidade e em literatura estabelecidas para outros corantes, uma vez que não havia registros das mesmas no início desta pesquisa. Adicionalmente, como padronizado para estudos ecotoxicológicos, foram realizados ensaios preliminares para cada um dos organismos-teste e tipos de ensaios utilizados, visando estabelecer uma faixa de concentrações, a partir da qual foram definidas as concentrações-teste finais. Para cada organismo-teste, a concentração definida para o estudo é informada no item correspondente ao ensaio de toxicidade, descritos a seguir.

## 3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Os ensaios de inibição da luminescência de *Vibrio fischeri* foram realizados segundo a Norma ABNT NBR15411-3:2012 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012), com o equipamento Analisador de Toxicidade Sistema Microtox Modelo 500, Software Microtox Omni (Azur Environmental, USA) na CETESB de Ribeirão Preto, sob supervisão do Dr. Eduardo Angelino Savazzi. Para este ensaio utilizou-se uma cultura liofilizada da bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*, contendo $10^8$ células por ampola, estocadas em freezer (entre -25 e -20°C).

Inicialmente, foi realizado um ensaio de sensibilidade do organismo teste com sulfato de zinco heptahidratado (controle positivo) nas concentrações de 0,77; 1,55; 3,09; 6,19; 12,38; 24,75 e 49,50 mg/L. A bactéria foi ressuspendida com a solução de reconstituição e a luminescência foi mensurada antes e após 15 minutos de contato entre o organismo e as diluições do sal. Os resultados foram expressos em $CE_{50}$ (Concentração Efetiva da amostra capaz de reduzir 50% da luminescência dos organismos expostos).

Posteriormente, a bactéria foi exposta a sete concentrações dos corantes DR 60, DR 73 e DR 78: 0,14; 0,28; 0,56; 1,12; 2,25; 4,50 e 9,00 mg/L. Os corantes foram solubilizados em dimetilsulfóxido e posteriormente testados utilizando a concentração máxima de solvente de 0,01% em solução de cloreto de sódio 2% (m/v). O controle negativo foi composto de 0,01% de DMSO em solução de cloreto de sódio 2% (m/v). O ensaio foi realizado em temperatura constante de 15°C e

empregou-se o protocolo “90,0% Basic Test” (AZUR ENVIRONMENTAL, 1998). A luminescência da bactéria foi mensurada antes do contato com os corantes e após 15 minutos de contato.

As amostras de corantes comumente apresentam forte coloração, que podem interferir na leitura da luminescência, sendo necessário realizar o procedimento de correção da cor. Nesse procedimento, realizou-se a leitura da absorvância das amostras em espectrofotômetro e posteriormente inseriu-se os valores observados no programa MicrotoxOmni, que corrigiu a luminescência. Os resultados foram expressos em Concentração Efetiva da amostra que causou redução de 20% na luminescência dos organismos após quinze minutos de exposição.

Para validação dos resultados de toxicidade das amostras e controle positivo é necessário que o valor do fator de correção (empregado para correção dos valores de luminescência) seja igual ou maior que 0,7 e $CE_{50}$ do sulfato de zinco (controle positivo) esteja dentro da faixa de 3,00 a 10,00 mg/L (CETESB, 2001; ABNT, 2012).

### 3.3 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os ensaios com *Daphnia similis* foram realizados segundo as recomendações da OECD n° 202 (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004), no Setor de Laboratórios de Ribeirão Preto da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB), sob supervisão do Dr. Eduardo Angelino Savazzi, e no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), Universidade de São Paulo (USP), sob supervisão do Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola.

Os organismos foram mantidos em meio MS na CETESB e meio ASTM no CRHEA, sendo que ambos eram alimentados diariamente com 3,2 X $10^6$ células da alga *Raphidocelis subcapitata* e 0,02 mL de solução de alimento composto (ração para peixe Tetramin® e levedura) por *Daphnia*/dia e mantidos em fotoperíodo de 16 horas sob a temperatura de 20 ± 2°C. A troca do meio de cultivo foi realizada três vezes por semana e as culturas foram mantidas no laboratório até a idade de 28 dias.

Os ensaios com *Daphnia similis* foram realizados em dois diferentes meios de cultivo, sendo meio de cultivo MS preparado com água destilada e meio de cultivo ASTM preparado com água natural de rio coletada em Cachoeira de Emas e cedida pela Cetesb de Ribeirão Preto. O uso de água natural de rios para a preparação do

meio de cultivo possui vantagens por representarem um cenário mais próximo de real, ou seja, de ambientes que realmente podem ser acometidos pelo descarte de corantes têxteis.

A sensibilidade das culturas de *Daphnia similis* foi avaliada mensalmente com cloreto de potássio (KCl). Nesse ensaio, os organismos foram expostos ao sal nas concentrações estabelecidas em cada laboratório, além de controle negativo, meio MS ou ASTM. Cada concentração foi avaliada em quadruplicata com cinco organismos em cada réplica. Os ensaios foram incubados por 48 horas, com fotoperíodo de 16 horas e sem alimentação. Após a fase de exposição, os indivíduos foram avaliados visualmente quanto à sua mobilidade e foram contabilizados os organismos imóveis, ou seja, incapazes de nadarem após leve agitação da amostra.

O corante DR 60 foi testado nas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 20,0 mg/L nos dois meios de cultivo; o corante DR 73 foi avaliado nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,15; 0,25; 1,0 e 1,5 mg/L em meio ASTM e nas concentrações de 0,1; 0,12; 0,15; 0,18; 0,2; 0,5 e 1,0 mg/L em meio MS; e o corante DR 78 foi testado nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,75; 0,1 e 0,25 mg/L em meio ASTM e nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1 e 1 mg/L . As concentrações foram definidas após a realização de ensaios preliminares e considerando-se ainda a solubilidade das amostras (dados não apresentados). Os corantes foram solubilizados em dimetilsulfóxido e posteriormente testados utilizando a concentração máxima de solvente de 0,01%, segundo as recomendações da OECD nº 202.

As neonatas foram expostas a 10 mL de amostra de corantes, controle negativo (meio MS ou meio ASTM) e controle do solvente (0,01% de DMSO em meio MS ou ASTM). Os ensaios foram realizados em quadruplicata, com cinco organismos em cada réplica, incubados por 48 horas, com fotoperíodo de 16 horas e sem alimentação. Para a validação dos resultados, a porcentagem dos organismos imóveis no controle negativo e controle do solvente não pode exceder 10%.

Ao final do ensaio, a concentração efetiva que causou imobilidade em 50% dos organismos expostos, $CE_{50}$ 48 h, foi calculada através do método estatístico *Trimmed Spearman Karber*, com um intervalo de confiança de 95%, e os resultados foram expressos em mg/L (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

### 3.4 Ensaios de embriotoxicidade com *Danio rerio*

Os ensaios com *Danio rerio* foram realizados durante o estágio de doutorado no exterior, no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro, Aveiro, em Portugal, sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Alexandre Sarabando Gravato.

Os organismos adultos foram mantidos em aquários de 3,5 L no equipamento ZEBTEC (Tecniplast, Itália), na densidade de 3-6 adultos/litro, a 26 ± 1°C, pH 7,5 ± 0,5, condutividade de 750 ± 50 µS/cm, oxigênio com saturação de 95%, fotoperíodo de 14 horas e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (ZM400 Granular). O ZEBTEC possui um sistema completo com unidade dedicada para o tratamento e monitoramento constantemente a água.

Para aquisição dos embriões de *zebrafish*, no dia anterior à realização dos ensaios foram adicionadas esferas de vidro ("bolinhas de gude") nos aquários selecionados para reprodução para evitar que os peixes adultos comessem os ovos. O acasalamento foi iniciado logo após a iluminação súbita do aquário na manhã seguinte. Cerca de 60 minutos após a desova, os ovos foram coletados e transferidos para uma placa Petri. Todos os ovos foram analisados em estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) e apenas os organismos que alcançaram o estágio de blástula foram selecionados para os experimentos. Os ovos foram dispostos individual e aleatoriamente em poços de placas para cultura contendo 2,0 mL de cada concentração da solução de corante ou controles. Os organismos não foram alimentados durante a realização dos experimentos, visto que neste período se alimentam do vitelo.

Cabe ressaltar que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP (Protocolo n°15.1.449.60.8, emitido em 28 de agosto de 2015 - ANEXO 1).

Os ensaios foram realizados segundo as recomendações da OECD n°236 (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2013). Os tratamentos foram compostos por controle negativo (água de cultivo), controle do solvente (dimetilsulfóxido 0,01% em água de cultivo), sete concentrações de cada corante e controle positivo (3,4 dicloroanilina, 4 mg/L). Os ensaios foram realizados em triplicata, cada tratamento foi constituído por 20 embriões e as placas de cultura foram mantidas a 26 ± 1°C com fotoperíodo de 14 horas por 144 horas. O corante Disperse Red 60 e Disperse Red 73 foram avaliados nas concentrações de 0,01;

0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L, enquanto o corante Disperse Red 78 foi avaliado nas concentrações de 0,01; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L.

Os *endpoints* foram avaliados diariamente segundo OECD n°236 (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2013) e Nagel (2002), sendo:

- Letalidade: ovo coagulado, cauda não desprendida, ausência de somitos e batimentos cardíacos.
- Subletalidade: desenvolvimento dos olhos, movimentos espontâneos, circulação sanguínea, pigmentação e inflação da bexiga natatória.
- Teratogenicidade: malformação na cabeça, otólitos, cauda ou coração, escoliose, raquitismo, deformidade no saco vitelínico e alterações no crescimento.

A distinção entre desenvolvimento embrionário normal e anormal foi estabelecida de acordo com a descrição da embriogênese de *D. rerio* publicada por Kimmel et al. (1995). Ao final dos experimentos, após avaliar a normalidade e homocedasticidade pelos testes Shapiro-Wilk e Bartlett, foi realizada a comparação entre as médias de cada tratamento com seus respectivos controles empregando ANOVA e teste de Dunnett (nível de significância de 5%).

### 3.5 Avaliação do comportamento de larvas expostas aos corantes dispersos

Os ensaios de comportamento foram realizados de acordo com Henriques et al. (2016) e Abe et al. (2017a). Após o acasalamento dos peixes adultos, os ovos viáveis de *zebrafish* foram dispostos individualmente em placas de 96 poços contendo 200 µL de cada concentração subletal da solução de corante e controles. As concentrações avaliadas foram definidas a partir dos ensaios de embriotoxicidade com *Danio rerio* (FET). Cada tratamento foi constituído por 20 embriões e as placas de cultura foram mantidas a 26 ± 1°C, com fotoperíodo de 14 horas. O tratamento foi composto por controle negativo (água de cultivo), controle do solvente (dimetilsulfóxido 0,01% em água de cultivo) e quatro concentrações da amostra de corante, sendo essas 0,01; 0,125; 0,25 e 0,5 mg/L para os corantes Disperse Red 60 e Dispere Red 73 e 0,01; 0,3; 0,6 e 1,25 para o corante Disperse Red 78. Após 144 horas de fertilização, os organismos foram acompanhados em um sistema de monitoramento de alto rendimento (Zebrabox® e software Zebralab, ViewPoint Life

Science, Lyon, France). O período total de monitoramento foi de 50 minutos, sendo os primeiros 10 minutos na ausência de luz para aclimatação, seguido de 2 ciclos de luz e escuro intercalados usando iluminação LED para ciclos de luz e ciclos infravermelhos para escuridão. A distância mínima de 0,5 mm foi definida como inativo e os dados foram obtidos automaticamente a cada 60 segundos (período de integração). Ao final os resultados foram estatisticamente avaliados quanto a normalidade e homocedasticidade pelos testes Shapiro-Wilk e Bartlett e posteriormente foi realizada a comparação entre controles e tratamentos empregando ANOVA e teste de Dunnett. Diferenças significativas foram consideradas com $p<0,05$.

### 3.6 Avaliação dos biomarcadores enzimáticos e reservas energéticas em *zebrafish* expostos aos corantes

Inicialmente 20 ovos selecionados foram expostos em placas de Petri contendo 15 mL de solução de corante ou controles, sendo 8 réplicas por condição avaliada. Os tratamentos foram compostos por controle negativo (água de cultivo), controle do solvente (dimetilsulfóxido 0,01% em água de cultivo), quatro concentrações subletais dos corantes Disperse Red 60 e Disperse Red 73 (0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/L) e cinco concentrações subletais do corante Disperse Red 78 (0,001; 0,01; 0,1 e 1 e 10 mg/L). As placas de Petri foram mantidas a 26 ± 1°C, com fotoperíodo de 14 horas. Após o período de 96 horas, os organismos foram transferidos para microtubos de 2 mL e o conteúdo líquido foi totalmente retirado com auxílio de pipeta. Em seguida, os frascos foram submersos em nitrogênio líquido para rápido congelamento e transferidos para o freezer -80°C até o momento de análise.

No dia de processamento das amostras, o material contido em cada microtubo foi homogeneizado com 1600 µL de água ultrapura utilizando um sonicador (Ystral GmbH D-7801 Dottingen) por 10 segundos em banho de gelo. Ao final, o conteúdo foi fracionado em novos microtubos para análise da seguinte maneira:

- 300 µL para análise de lipídeos
- 300 µL para análise de proteínas de reserva e carboidratos
- 300 µL para análise de sistema transportador de elétrons (ETS), sendo que neste caso, o conteúdo foi misturado com 150 µL de tampão de homogeneização

para ETS, centrifugado a 1000 x g, a 4°C por 10 minutos e apenas a fração do sobrenadante foi utilizada

- 200 µL para análise da peroxidação lipídica, sende este conteúdo adicionado de 4 µL de 2,6 di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) 4% em metanol (v/v)

- 500 µL para análise de glutationa total, glutationa S-transferase, catalase, acetilcolinesterase e determinação de proteínas. Este conteúdo foi centrifugado com 500 µL de tampão fosfato (0,2M; pH=7,4) a 1000 x g, a 4°C por 20 minutos para isolar a fração pós mitocondrial. Dessa forma, o sobrenadante foi distribuído em novos microtubos, sendo: 250 µL para glutationa total, 250 µL para glutationa S-transferase, 60 µL para catalase, 250 µL para acetilcolinesterase e 60 µL para determinação de proteínas.

Ao final deste processamento das amostras, todos os microtubos foram estocados em freezer a -80°C. As determinações bioquímicas foram realizadas em quadruplicata a 25 °C, empregando o leitor de microplacas Thermo Scientific Multiscan Sprectrum.

### 3.6.1 Determinação de lipídeos

Inicialmente, o homogenato para quantificação de lipídeos foi misturado com clorofórmio, metanol e água, sendo centrifugado a 1000 x g, a 25°C por 5 minutos. A fase orgânica foi removida e transferida para um novo microtubo. Posteriormente adicionou-se ácido sulfúrico e incubou-se a 200°C por 15 minutos. Após o resfriamento das amostras, adicionou-se água e transferiu o conteúdo para microplas para em leitura em espectrofotômetro a 375 nm. A tripalmitina foi empregada como padrão para a curva de calibração. A metodologia seguiu a recomendação de De Coen e Janssen (1997).

### 3.6.2 Determinação de carboidratos e proteínas totais

O homogenato separado inicialmente foi acrescido de ácido tricloroacético 15% e incubado a -20°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g, a -4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e transferido para um novo microtubo para análise dos carboidratos, enquanto o pellet foi ressuspendido com hidróxido de sódio e aquecido a 60°C durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionado ácido clorídrico para neutralização e obteve-se a fase para análise de proteínas.

Na fração de análise de carboidratos foram adicionados fenol e ácido sulfúrico e posteriormente as amostras foram homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, realizou-se a leitura da absorbância em 492 nm. A glucose foi utilizada como padrão para curva de calibração.

Na fração de análise de proteínas foi adicionado reagente Bradford e as placas foram incubadas no escuro e em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em 592 nm. A γ-globulina bovina foi empregada como padrão na curva de calibração.

Ao final destes procedimentos, as reservas energéticas foram quantificadas por meio da soma de lipídeos, carboidratos e proteínas, realizando-se a transformação em equivalentes energéticos por entalpia de combustão, segundo o método descrito por De Coen e Janssen (1997). O valor final foi expresso em mJ por embrião.

### 3.6.3 Determinação da atividade do sistema transportador de elétrons (ETS)

A atividade do ETS foi determinada segundo De Coen e Janssen (1997). Inicialmente, acrescentou-se tampão de homogeneização, solução tamponada de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzida (NADPH), e solução de iodonitrotetrazolio (INT). Posteriormente, a absorbância foi monitorada a 490 nm por 3 minutos.

A taxa de oxigênio celular consumido foi determinada empregando a relação estequiométrica (2 µmol INT-formazan formado para 1 µmol oxigênio consumido) e posteriormente a quantidade de oxigênio consumido foi calculado, transformado em equivalentes energéticos e a atividade foi expressa em mJ/organismo/hora.

### 3.6.4 Avaliação da alocação da energia celular

Após calcular a energia disponível (Ed=soma da quantidade de lipídeos, carboidratos e proteínas) e energia consumida (Ec=atividade do ETS) foi possível avaliar a alocacação de energia celular (AEC), sendo esta definida por AEC = Ed/Ec, conforme descrito por Verslycke et al. (2003). Os valores foram expressos em mJ/organismo.

### 3.6.5 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada como descrito por Ohkawa et al. (1979) e Bird e Draper (1984), adaptado por Filho et al. (2001) e Torres et al. (2002). A medição foi realizada espectrofotometricamente a 535 nm pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ao final, os valores foram expressos em picomols de TBARS por embrião.

### 3.6.6 Determinação da Glutationa Total (GT)

A concentração de Glutationa Total (soma da glutationa reduzida - GSH e glutationa oxidada - GSSG) foi determinada segundo Tietze (1969) e Baker et al. (1990), por meio da reação entre a GSH e com o 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) na presença de glutationa redutase (GR). A absorbância foi monitorada a 412 nm durante 3 min e os valores expressos em µM/mg de proteína.

### 3.6.7 Determinação da atividade da glutationa S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada de acordo com Habig et al. (1974) e adaptado para microplacas por Frasco e Guilhermino (2002) pela quantificação da conjugação da glutationa reduzida com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A medição foi realizada em 340 nm por 5 min. A atividade enzimática foi expressa em nmol de conjugado de GSH/min/mg de proteína.

### 3.6.8 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada segundo Clairborne (1985), pela medição da absorbância resultante do consumo de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 0,05 M; pH=7. A reação foi monitorada durante 2 minutos em 240 nm (luz ultravioleta). A atividade da catalase foi expressa em µmol de peróxido degradado/min/mg de proteína.

### 3.6.9 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi determinada de acordo com Ellman et al. (1961), adaptada para microplaca conforme descrito em Guilhermino et al. (1996), com base na velocidade da produção de tiocolina pela hidrólise da acetilcolina. A atividade

desta enzima foi monitorada em 414 nm por 5 minutos e expressa como nmol/min/mg de proteína.

### 3.6.10 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (1976) e adaptada para microplacas segundo Guilhermino et al. (1996). A γ-globulina bovina foi utilizada como padrão e a medição espectrofotométrica foi realizada em 600 nm.

Ao final da avaliação dos biomarcadores e reservas energéticas, os dados foram estatisticamente avaliados quanto a normalidade e homocedasticidade pelos testes Shapiro-Wilk e Bartlett e posteriormente foi realizada a comparação entre controles e tratamentos empregando ANOVA e teste de Dunnett. Para dados não paramétricos foi utilizado Kruskall-Wallis. Todas as análises estatísticas foram realizadas empregando GraphPad Prism® (Ver 5.0, GraphPad Software) e significância estatística foi aceita com $p < 0.05$.

## 3.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

A atividade mutagênica foi avaliada pelo teste de Ames empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100. As amostras de corantes foram diluídas em dimetilsulfóxido e as concentrações variaram entre 0,1 e 5.000 µg/placa.

Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo de pré-incubação, na presença e ausência de ativação metabólica exógena (mistura S9) (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Essa solução é constituída por um homogenato de células de fígado de rato pré-tratado com a mistura de bifenilas policlorinadas (Aroclor 1254), que induz um aumento das isoenzimas (P450) neste órgão, e adição de cofatores necessários (MARON; AMES, 1983).

As linhagens de *Salmonella* foram mantidas em freezer (-70°C). No dia anterior ao ensaio, foram descongeladas, inoculadas no caldo nutriente e mantidas *overnight* a 37°C sob agitação de 150 a 170 rpm. Após o período de crescimento, as culturas foram mantidas em geladeira até o momento de uso.

No momento do ensaio, 100,0µL da cultura bacteriana de *Salmonella typhimurium*, 500,0 µL de tampão fosfato de sódio 0,2M (para ensaio na ausência de ativação metabólica) ou mistura S9 (para ensaio na presença de ativação metabólica) e 100,0 µL de solução de corante ou controle foram introduzidos em tubos de vidro e incubados por 30 minutos a 37°C. Após incubação, foram

adicionados 2,0 mL de top agar em cada tubo, que foram vertidos em placa contendo agar mínimo. As placas foram incubadas invertidas por 66 horas a 37°C.

O DMSO (100,0 uL) foi utilizado como controle negativo em todas as condições testadas. Para as linhagens TA98 e TA100 na ausência de S9 o controle positivo foi óxido de 4 nitroquinolina (0,05 µg/µL) e na presença de ativação metabólica foi o 2 aminoantraceno (0,25 µg/µL).

Os resultados foram expressos em média do número de revertentes por placa ± desvio padrão e potência mutagênica quando as amostras foram positivas. A potência mutagênica foi obtida através da inclinação da reta no gráfico, empregando o software Salanal. Esse software emprega o modelo Bernstein, que por sua vez, utiliza ANOVA e regressão linear na análise dos dados (BERSTEIN et al., 1982; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

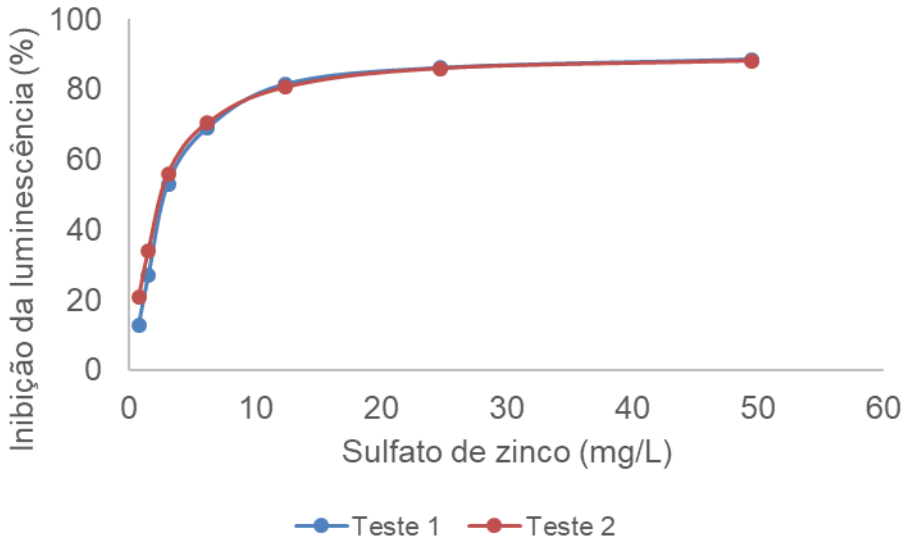
# 4. RESULTADOS

## 4.1 Ensaios de sensibilidade com os organismos-teste

Todos os organismos aquáticos empregados neste trabalho tiveram a sensibilidade avaliada visando garantir a confiabilidade dos resultados.

Para o ensaio com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* foi utilizada a carta controle construída com Sulfato de Zinco. Todos os testes apresentaram valores de fator de correção maior que 0,7 e $CE_{50}$ para o sulfato de zinco (controle positivo) dentro da faixa de 3,00 a 10,00 mg/L (Figura 8). Logo, todos os resultados foram validados.

Figura 8 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao sulfato de zinco (controle positivo)




Durante a realização dos ensaios com o microcrustáceo *Daphnia similis,* nos dois diferentes meios de cultivo (ensaios preliminares e definitivos), a sensibilidade dos organismos ao cloreto de potássio foi avaliada e as concentrações do sal que causaram imobilidade em 50% dos organismos expostos ($CE_{50}$) estão apresentadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Valores obtidos nos ensaios de sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de potássio em meio ASTM, realizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA)

| Cloreto de Potássio (KCl) | | |
|---|---|---|
| Teste | $CE_{50}$ 48h (mg/L) | Intervalo de confiança (95%) |
| 1 | 685,64 | 644,42 - 729,49 |
| 2 | 709,82 | 676,70 - 744,55 |
| 3 | 694,91 | 658,47 - 733,36 |
| Média ± Desvio Padrão: 696,79 mg/L ± 12,20 | | |

Tabela 4 - Valores obtidos nos ensaios de sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de potássio em meio MS realizado na Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB)

| Cloreto de Potássio (KCl) | | |
|---|---|---|
| Teste | $CE_{50}$ 48h (mg/L) | Intervalo de confiança (95%) |
| 1 | 935,00 | 872,03 - 1003,00 |
| 2 | 903,55 | 855,98 - 953,76 |
| Média ± Desvio Padrão: 919,28 mg/L ± 22,24 | | |

Os valores de $CE_{50}$ encontrados em todos os ensaios de sensibilidade estavam compreendidos no intervalo de ± 2 desvios padrão em relação aos valores médios da carta controle do CRHEA e CETESB, obtidos em ensaios realizados nos meses anteriores. Logo, a sensibilidade dos organismos estava dentro da faixa de aceitação para a realização dos ensaios com os corantes.

Nos ensaios com o peixe *Danio rerio*, os organismos do controle negativo apresentaram desenvolvimento regular, como descrito por Kimmel (1995), e a 3,4 dicloroanilina induziu mortalidade superior a 30% no controle positivo, como recomendado pela OECD n° 236.

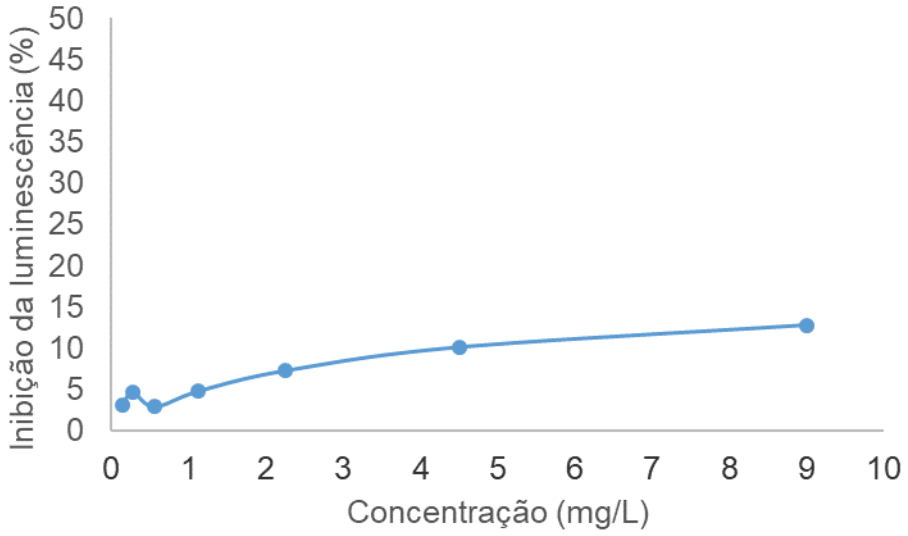
Nenhum dos corantes causou mortalidade significativa nos embriões expostos nas condições avaliadas.

## 4.2 Disperse Red 60

### 4.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

O corante Disperse Red 60 não induziu toxicidade em *Vibrio fischeri* nas condições testadas, ou seja, este corante não foi capaz de causar redução de 20% da luminescência até a concentração máxima testada (Figura 9).

Figura 9 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Disperse Red 60




### 4.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

O corante Disperse Red 60 não induziu imobilidade em nenhum organismo nas exposições utilizando os meios ASTM e MS, até a concentração máxima testada de 20 mg/L, considerando a solubilidade do corante em 0,01 % de dimetilsulfóxido em meio de cultivo (Tabela 5).

Tabela 5 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 60 por 48 horas em meio ASTM e meio MS

| Disperse Red 60 | Número de organismos imóveis | | | | | Imobilidade |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Réplicas | | | | | |
| Concentração (mg/L) | 1 | 2 | 3 | 4 | Total | Porcentagem (%) |
| Controle (meio ASTM) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| Controle do solvente | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 10,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 20,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| $CE_{50}$ 48h: vnc* | | | | | | |

*valor não calculado

### 4.2.3 Ensaios de embriotoxicidade com *Danio rerio*

O corante Disperse Red 60 induziu edemas oculares nos organismos a partir da concentração de 1,0 mg/L. Os valores da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO) obtidos no ensaio FET estão apresentados na Tabela 6 e os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela A e B (Apêndice 1).

Tabela 6 - Valores calculados de CENO e CEO para o corante Disperse Red 60

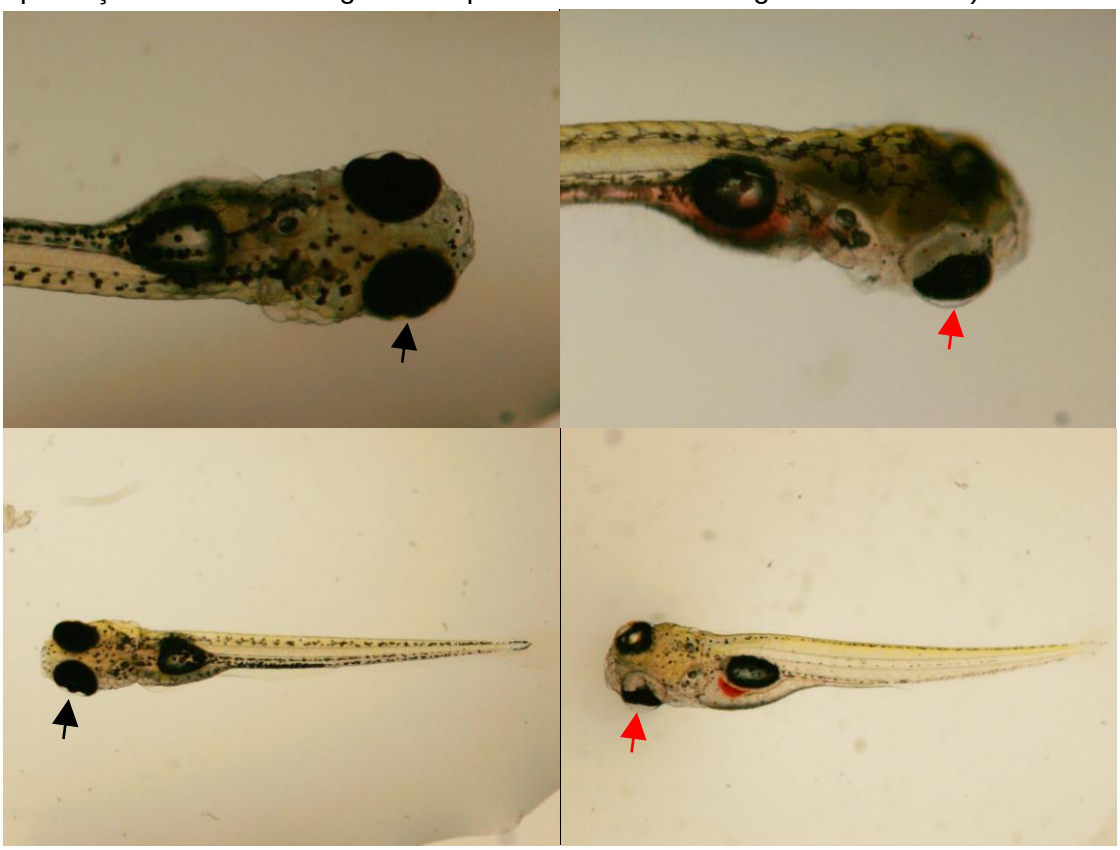
| CORANTE | Horas pós fertilização | EDEMA OCULAR | |
|---|---|---|---|
| | | CENO | CEO |
| DR60 | 48 | X | X |
| | 72 | X | X |
| | 96 | 0,5 | 1,0 |
| | 120 | 0,5 | 1,0 |
| | 144 | 0,5 | 1,0 |

DR60: Disperse Red 60
CENO: concentração de efeito não observado
CEO: concentração de efeito observado
X: não foi calculado

O desenvolvimento dos  dos olhos foi observado diariamente durante todo o ensaio, porém os edemas oculares foram visualizados com mais clareza a partir de 96 horas pela posição do organismo na placa de cultura, visto que a partir deste

período, com a inflação da bexiga natatória, eles comumente ficam em posição dorsal, facilitando a visualização dos edemas, como apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Comparação entre um organismo não exposto ao corante Disperse Red 60 (esquerda) e exposto à 4 mg/L do corante Disperse Red 60 (direita) por 144 horas. As setas indicam o aspecto de desenvolvimento dos olhos, sendo que a seta preta aponta para o desenvolvimento normal dos olhos e a seta vermelha aponta para o edema ocular. (Amplificação de 4X nas fotografias superiores e 3X nas fotografias inferiores)



#### 4.2.4 Avaliação do comportamento de larvas de *Danio rerio*

Os valores calculados de Concentração de Efeito Não Observado, Concentração de Efeito Observado e da análise estatística empregando ANOVA estão apresentados na Tabela C (Apêndice 1).

Com relação à análise comportamental, consideramos para apresentação gráfica os resultados obtidos nos últimos ciclos, tanto claro quanto escuro, visto que os efeitos foram mais acentuados nestes ciclos. De modo geral, as larvas expostas aos controles e corantes apresentaram maior distância total de natação e maior tempo total de natação durante os ciclos no escuro, reduzindo durante os ciclos claros.

O corante DR 60 diminuiu a distância total de natação já na primeira concentração testada de 0,01 mg/L no ciclo claro e na concentração de 0,125 mg/L no ciclo escuro. Com relação ao tempo total de natação a redução foi observada a partir da concentração de 0,125 em ambos os ciclos (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Distância total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 60 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle

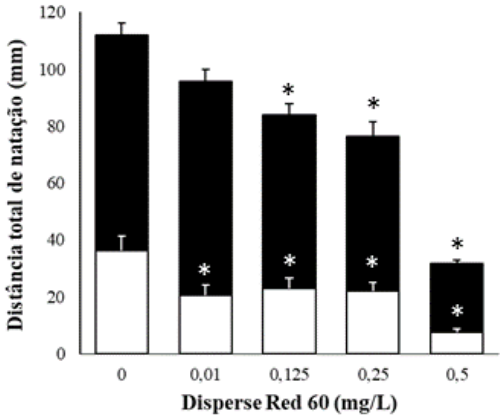
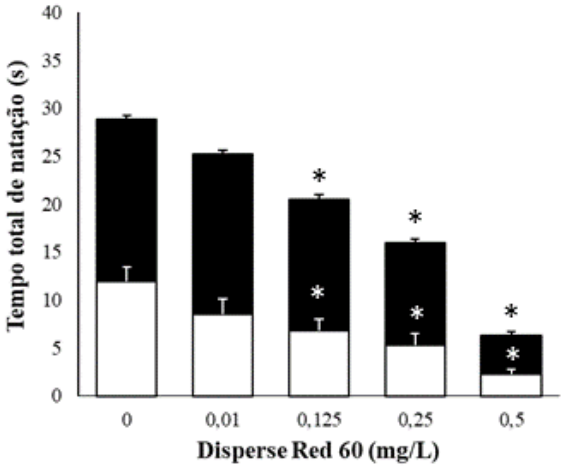



Figura 12 - Tempo total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 60 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle



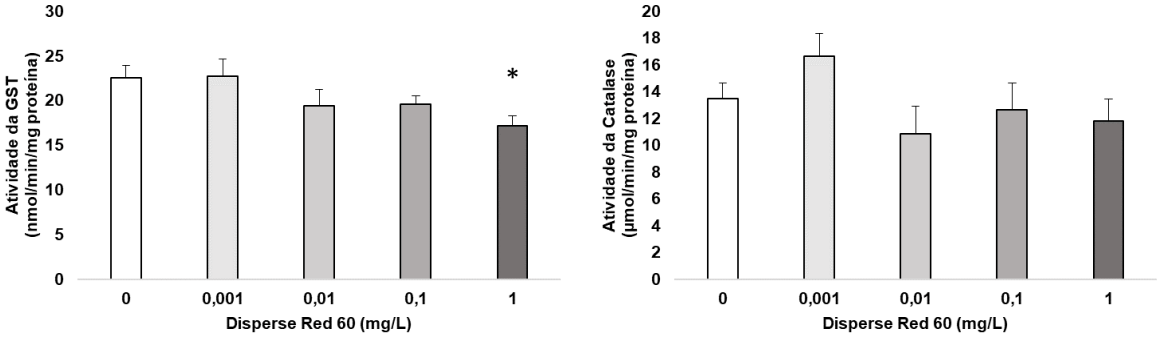
### 4.2.5 Biomarcadores bioquímicos

#### 4.2.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxificação

Os resultados da análise estatística empregando ANOVA, para todos os biomarcadores avaliados, estão apresentados na Tabela D (Apêndice 1).

O corante Disperse Red 60 reduziu a atividade da enzima Glutationa S-transferase na concentração de 1 mg/L e não modificou a atividade da enzima catalase (Figura 13).

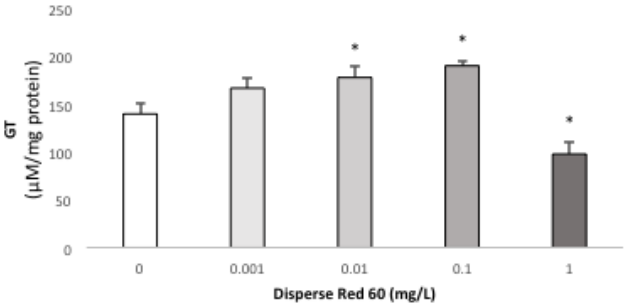
Figura 13 - Atividade das enzimas glutationa S-transferase (esquerda) e catalase (direita) em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




#### 4.2.5.2 Níveis de antioxidante não enzimático

O corante Disperse Red 60 aumentou os níveis de glutationa total em organismos expostos às concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L e diminuiu na maior concentração avaliada, 1 mg/L (Figura 14).

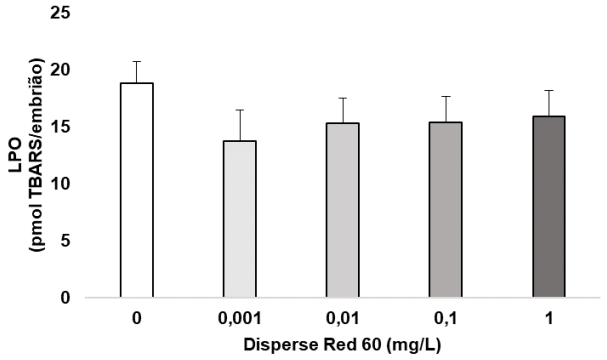
Figura 14 - Níveis de glutationa total em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05



#### 4.2.5.3 Peroxidação lipídica

Não houve peroxidação lipídica em nenhuma condição de exposição ao corante Disperse Red 60 (Figura 15).

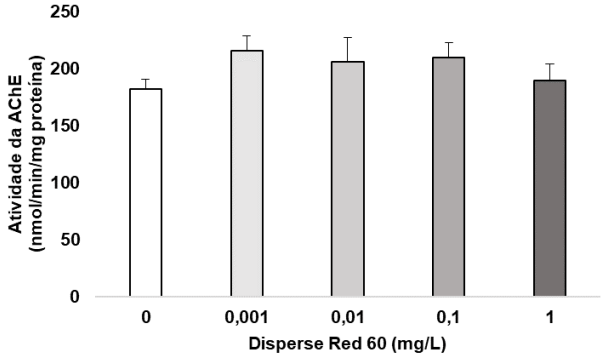
Figura 15 - Níveis de peroxidação lipídica em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




#### 4.2.5.4 Acetilcolinesterase

O corante Disperse Red 60 não alterou a atividade da enzima acetilcolinesterase (Figura 16).

Figura 16 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 60 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




### 4.2.6 Reservas e consumo de energia

#### 4.2.6.1 Energia disponível

De acordo com os resultados obtidos, os lipídeos são as principais fontes de energia (83,5-95,9%), seguido pelos carboidratos (2,4-8,6%) e proteínas (1,9-7,9%), considerando os três corantes dispersos.

O corante Disperse Red 60 não alterou as frações de energia em embriões de *zebrafish* (Tabela 7).

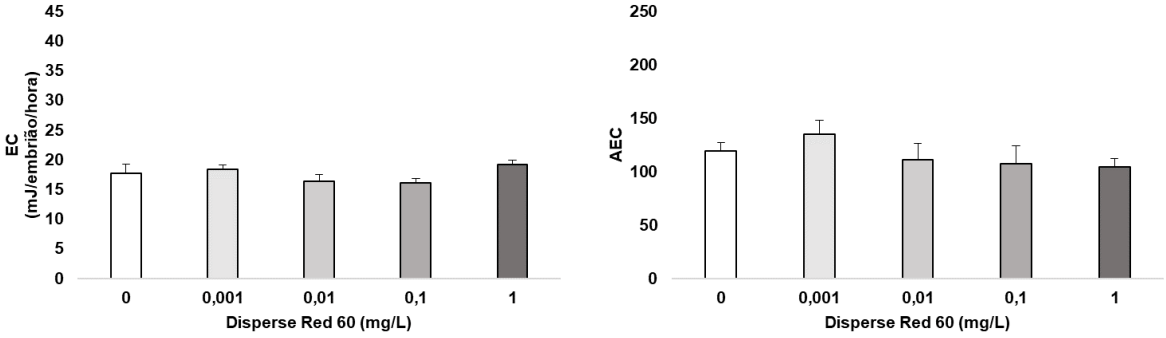
Tabela 7 - Frações de energia disponível e energia disponível total de larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Diserse Red 60. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05

| Tratamento | Frações de ED (%) | | | Ed total (mJ/embrião) |
|---|---|---|---|---|
| | Lipídeos | Carboidratos | Proteínas | |
| **DR60** | | | | |
| 0 | 94 ± 0,9 | 3.8 ± 0,3 | 2.4 ± 0,6 | 1908 ± 215 |
| 0,001 | 95 ± 0,6 | 3.1 ± 0,4 | 1.9 ± 0,3 | 2463 ± 252 |
| 0,01 | 94 ± 0,8 | 3.7 ± 0,5 | 1.9 ± 0,2 | 1728 ± 156 |
| 0,1 | 94 ± 1,2 | 3.9 ± 0,7 | 2.8 ± 0,5 | 1891 ± 367 |
| 1,0 | 93 ± 0,8 | 3.6 ± 0,4 | 3.1 ± 0,5 | 1979 ± 126 |

#### 4.2.6.2 Energia consumida e alocação de energia celular

O corante Disperse Red 60 não alterou a energia total consumida, assim como a alocação de energia celular nos organismos expostos (Figura 17).

Figura 17 - Energia consumida (esquerda) e alocação de enrgia celular (direita) em larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 60. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




### 4.2.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O corante Disperse Red 60 não induziu mutagenicidade em nenhuma das condições testadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 60 empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100

| Concentração (µg/placa) | Média do número de revertentes/placa ± desvio padrão | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Disperse Red 60 | | | |
| | TA98 | | TA100 | |
| | SEM S9 | COM S9 | SEM S9 | COM S9 |
| Controle negativo (0) | 37,6 ± 4,8 | 43,6 ± 4,2 | 227,6 ± 4,3 | 220,5 ± 6,0 |
| 0,5 | 35,0 ± 5,2 | 51,3 ± 2,5 | 233,3 ± 16,5 | 222,0 ± 2,8 |
| 5 | 31,3 ± 4,0 | 47,0 ± 1,0 | 207,3 ± 8,1 | 262,0 ± 32,5 |
| 25 | 35,0 ± 7,8 | 51,0 ± 2,6 | 208,0 ± 19,7 | 266,0 ± 33,9 |
| 100 | 41,7 ± 3,2 | 53,0 ± 7,9 | 211,3 ± 15,0 | 282,0 ± 25,4 |
| 250 | 35,7 ± 6,4 | 51,5 ± 0,7 | 218,3 ± 26,6 | 245,0 ± 7,1 |
| Controle positivo | 416,0 ± 15,6[a] | 1166,0 ± 93,3[b] | 2055,0 ± 106,1[a] | 2165,0 ± 205,1[b] |
| Potência mutagênica (rev/µg) | X | X | X | X |

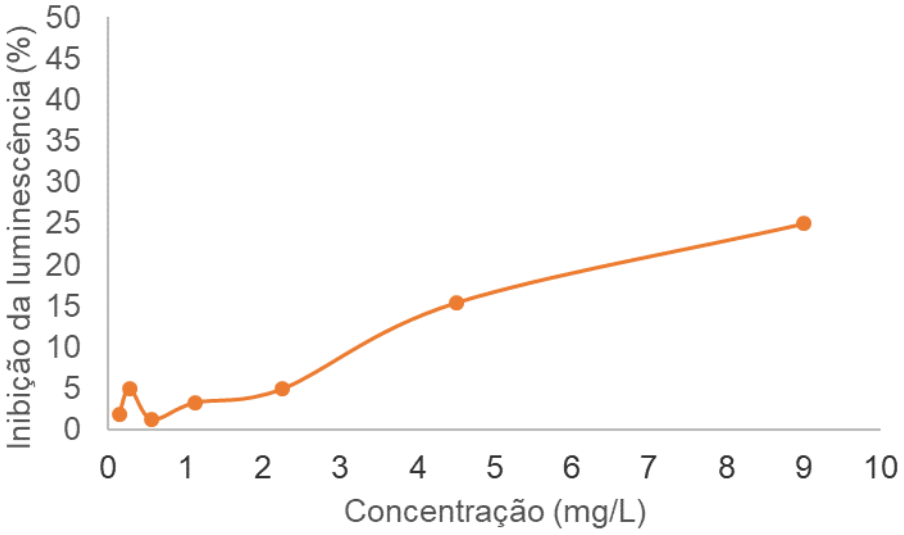
[a]: óxido de 4 nitroquinolina (0,05 µg/µL)
[b]: 2 aminoantraceno (0,25 µg/ µL)
X: não mutagênico

## 4.3 Disperse Red 73

### 4.3.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

O corante Disperse Red 73 causou toxicidade aguda no organismo teste, reduzindo 20% da luminescência de *Vibrio fischeri* na concentração de 6,41 mg/L (Figura 18).

Figura 18 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Disperse Red 73



### 4.3.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

O corante Disperse Red 73 induziu imobilidade em 50% dos organismos expostos na concentração de 0,19 mg/L em meio ASTM (Tabela 9). No meio de cultivo MS, o corante Disperse Red 73 induziu imobilidade em 50% dos organismos expostos na concentração de 0,26 mg/L (Tabela 10).

Tabela 9 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 73 por 48 horas em meio ASTM e valor de $CE_{50}$ com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber

| Disperse Red 73 | Número de organismos imóveis | | | | Imobilidade | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Réplicas | | | | | |
| Concentração (mg/L) | 1 | 2 | 3 | 4 | Total | Porcentagem (%) |
| Controle (meio ASTM) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| Controle do solvente | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 4/20 | 20 |
| 0,15 | 2 | 3 | 1 | 1 | 7/20 | 35 |
| 0,25 | 3 | 3 | 5 | 4 | 15/20 | 75 |
| 1,0 | 5 | 4 | 5 | 3 | 17/20 | 85 |
| 1,5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 18/20 | 90 |
| $CE_{50}$ 48h: 0,19 (0,13-0,29) mg/L | | | | | | |

Tabela 10 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 73 por 48 horas em meio MS e valor de CE50 com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber

| Disperse Red 73 | Número de organismos imóveis | | | | Imobilidade | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Réplicas | | | | | |
| Concentração (mg/L) | 1 | 2 | 3 | 4 | Total | Porcentagem (%) |
| Controle (meio MS) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| Controle do solvente | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1/20 | 5 |
| 0,12 | 0 | 2 | 0 | 1 | 3/20 | 15 |
| 0,15 | 1 | 0 | 0 | 2 | 3/20 | 15 |
| 0,18 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3/20 | 15 |
| 0,20 | 2 | 2 | 3 | 2 | 9/20 | 45 |
| 0,5 | 4 | 5 | 4 | 4 | 17/20 | 85 |
| 1,0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 20/20 | 100 |
| $CE_{50}$ 48h: 0,26 (0,21-0,31) mg/L | | | | | | |

### 4.3.3 Ensaios com as formas iniciais do desenvolvimento de *Danio rerio*

Os valores da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO) obtidos no ensaio FET estão apresentados na Tabela 11 e os resultados da ANOVA estão apresentados nas Tabelas A e B (Apêndice 1).

Tabela 11 - Valores calculados de CENO e CEO para o corante Disperse Red 60 e Disperse Red 73

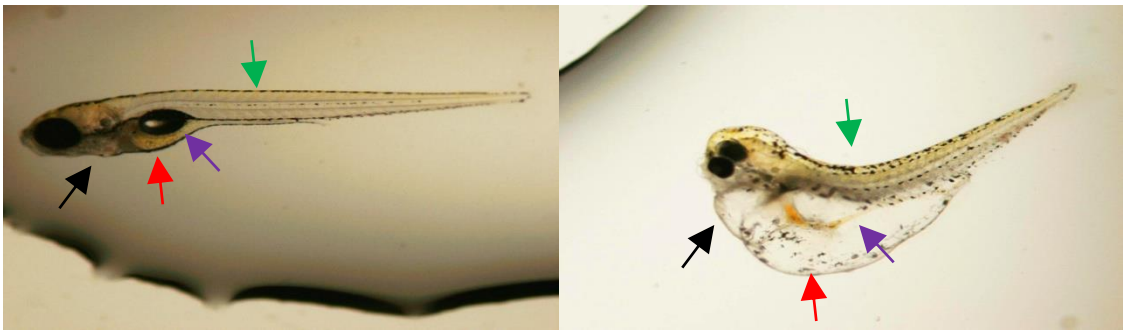
| COR | Hpf | N.I.B.N | | E.P. | | ES | | S.V.A | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CENO | CEO | CENO | CEO | CENO | CEO | CENO | CEO |
| DR73 | 48 | X | X | 0,25 | 0,5 | 2,0 | 4,0 | 1,0 | 2,0 |
| | 72 | X | X | 0,25 | 0,5 | 2,0 | 4,0 | 1,0 | 2,0 |
| | 96 | 0,125 | 0,25 | 0,25 | 0,5 | 2,0 | 4,0 | 1,0 | 2,0 |
| | 120 | 0,125 | 0,25 | X | X | 1,0 | 2,0 | 0,5 | 1,0 |
| | 144 | 0,125 | 0,25 | X | X | 1,0 | 2,0 | 0,5 | 1,0 |

COR: corante
DR73: Disperse Red 73
hpf: horas pós fertilização
N.I.B.N.: não inflação da bexiga natatória
E.P.: edema do pericárdio
ES: escoliose
S.V.A.: saco vitelínico anormal
CENO: concentração de efeito não observado
CEO: concentração de efeito observado
X: não foi calculado

O corante Disperse Red 73 reduziu a inflação da bexiga natatória a partir da concentração de 0,25 mg/L, induziu edema do pericárdio a partir de 0,5 mg/L, apresentando saco vitelínico anormal a partir de 1,0 mg/L e escoliose a partir de 2,0 mg/L. Os efeitos de não inflação da bexiga natatória e edema do pericárdio aumentaram apenas de acordo com a concentração, já o saco vitelínico anormal e escoliose aumentaram conforme a concentração e tempo de exposição (Tabela 11). Os organismos expostos ao DR 73 foram fotografados e as imagens capturadas estão apresentadas nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 - Comparação entre um organismo não exposto (esquerda) e exposto à 4 mg/L do corante Disperse Red 73 (direita) por 72 horas. As setas apontam o coração, sendo que a seta preta aponta para o desenvolvimento normal do coração e a seta vermelha indica edema cardíaco. (Amplificação 3X)

Figura 20 - Comparação entre um organismo não exposto (esquerda) e exposto à 4 mg/L do corante Disperse Red 73 (direita) por 144 horas. As setas pretas apontam o coração, as setas vermelhas apontam o saco vitelínico, a seta roxa aponta a localização da bexiga natatória e a seta verde aponta para a coluna vertebral (Amplificação 3X)



### 4.3.4 Avaliação do comportamento de larvas de *Danio rerio*

O corante Disperse Red 73 aumentou a distância total de natação nas três menores concentrações avaliadas no ciclo claro e escuro, porém no período de escuridão a maior concentração avaliada (0,5 mg/L) foi capaz de reduzir essa distância comparado ao controle. Com relação ao tempo total de natação, uma mesma resposta foi observada, visto que as três menores concentrações foram capazes de aumentar o tempo tanto no ciclo claro quanto escuro, ao passo que a maior concentração avaliada reduziu o tempo de natação dos organismos expostos apenas no ciclo escuro (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Distância total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 73 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle

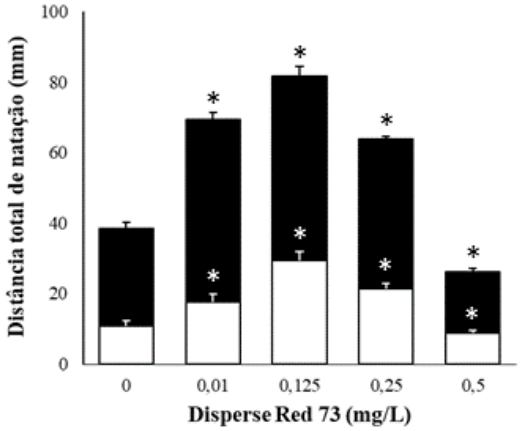
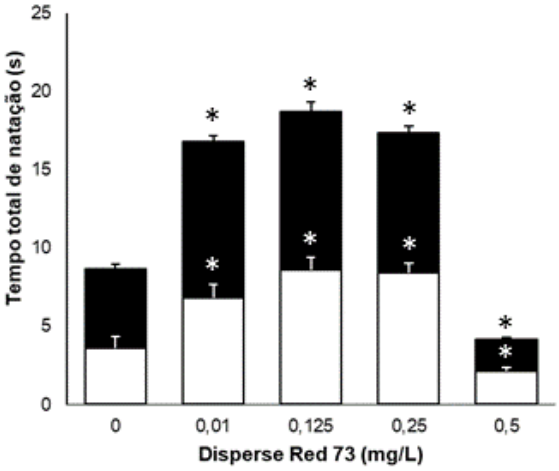



Figura 22 - Tempo total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 73 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05

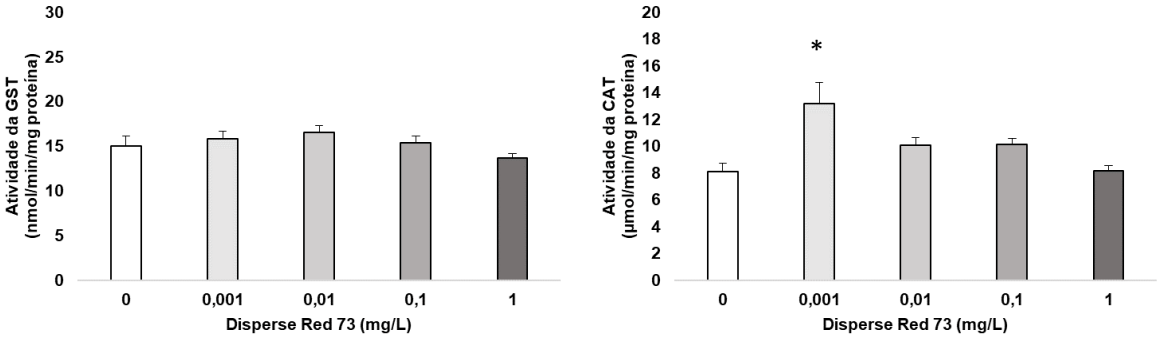



### 4.3.5 Biomarcadores bioquímicos

#### 4.3.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxificação

O corante Disperse Red 73 não alterou a atividade da enzima glutationa S-transferase em nenhuma condição avaliada. No entanto, este corante aumentou a atividade da enzima catalase na menor concentração testada, 0,001 mg/L (Figura 23).

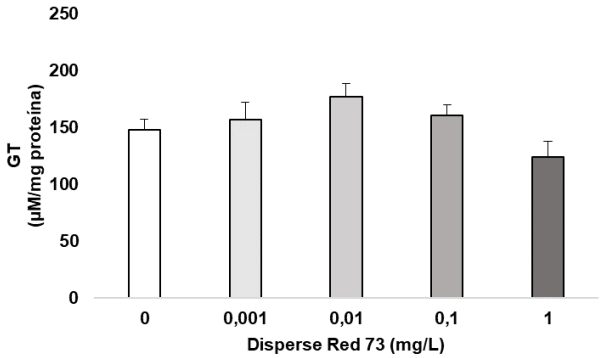
Figura 23 - Atividade das enzimas glutationa S-transferase (esquerda) e catalase (direita) em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




#### 4.3.5.2 Níveis de antioxidante não enzimático

O corante Disperse Red 73 não alterou os níveis de glutationa total em nenhuma condição avaliada (Figura 24).

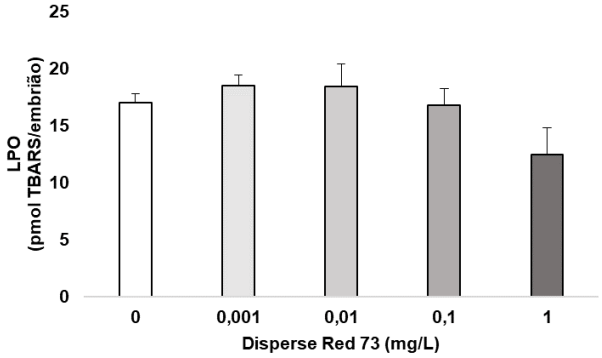
Figura 24 - Níveis de glutationa total em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




#### 4.3.5.3 Peroxidação lipídica

O corante Disperse Red 73 não induziu peroxidação lipídica em nenhuma condição avaliada (Figura 25).

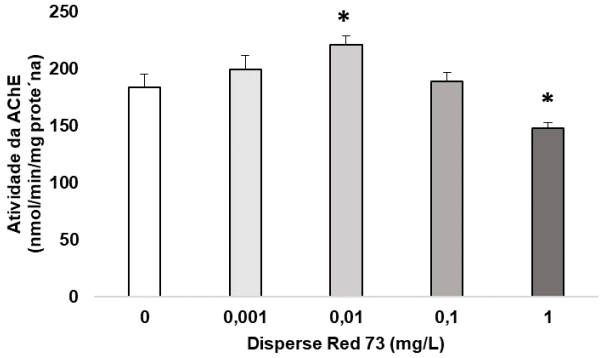
Figura 25 - Níveis de peroxidação lipídica em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




#### 4.3.5.4 Acetilcolinesterase

O corante Disperse Red 73 aumentou a atividade desta enzima na concentração de 0,01 mg/L, e reduziu a atividade da mesma na concentração de 1 mg/L (Figura 26).

Figura 26 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




### 4.3.6 Reservas e consumo de energia

#### 4.3.6.1 Energia disponível

O corante Disperse Red 73 não alterou as frações de energia disponível nos organismos expostos (Tabela 12).

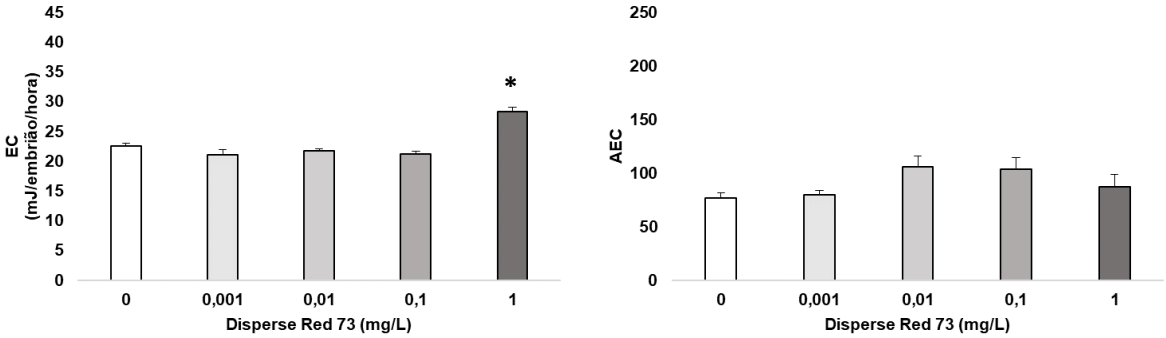
Tabela 12 - Frações de energia disponível e energia disponível total de larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 73. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05

| Tratamento | Frações de ED (%) | | | Ed total (mJ/embrião) |
|---|---|---|---|---|
| | Lipídeos | Carboidratos | Proteínas | |
| **DR73** | | | | |
| 0 | 95 ± 0,9 | 3.0 ± 0,4 | 2.6 ± 0,4 | 1745 ± 111 |
| 0,001 | 94 ± 0,7 | 3.3 ± 0,4 | 2.9 ± 0,3 | 1927 ± 216 |
| 0,01 | 95 ± 0,5 | 3.4 ± 0,7 | 2.8 ± 0,1 | 2416 ± 378 |
| 0,1 | 94 ± 0,8 | 2.8 ± 0,4 | 3.3 ± 0,5 | 2398 ± 281 |
| 1,0 | 94 ± 0,8 | 2.5 ± 0,4 | 3.0 ± 0,4 | 2748 ± 352 |

#### 4.3.6.2 Energia consumida e alocação de energia celular

O corante Disperse Red 73 aumentou a energia consumida nos embriões expostos a maior concentração avaliada, 1 mg/L. No entanto, essa alteração não foi suficiente para modificar a alocação de energia celular (Figura 27).

Figura 27 - Energia consumida (esquerda) e alocação de enrgia celular (direita) em larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 73. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




### 4.3.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O corante comercial Disperse Red 73 causou mutagenicidade na linhagem TA 98 e TA 100 na presença e ausência de metabolização exógena (S9). Considerando o alto potencial mutagênico, decidiu-se avaliar a mutagenicidade do corante Disperse Red 73 na sua forma purificada, a fim de verificar se esse efeito era devido ao corante ou às impurezas contidas na formulação. A purificação foi realizada em

parceria com a Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni e com o Dr. Jefferson Franco, ambos pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara.

Ao final dos ensaios, foi possível observar que o corante purificado é cerca de 6 e 2 vezes menos mutagênico para a linhagem TA 98 na ausência e presença de metabolização exógena, respectivamente. No entanto, também se verificou que o corante purificado é cerca de 3,4 vezes mais mutagênico quando comparado ao corante comercial para a linhagem TA 100 na ausência de metabolização exógena (Tabela 13).

Os resultados obtidos nos ensaios de mutagenicidade foram publicados no periódico Science of The Total Environment. Franco, J. H.; da Silva, B. F.; Oliveira, R. V.; Meireles, G.; Oliveira, D. P.; Castro, A. A.; Ramalho, T. C. Zanoni, M. V. B. 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 (ANEXO 2).

Tabela 13 - Avaliação da mutagenicidade dos corantes Disperse Red 73 comercial e Disperse Red 73 purificado empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100

| Concentra-ção (µg/placa) | Média do número de revertentes/placa ± desvio padrão | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Disperse Red 73 Comercial | | | | Disperse Red 73 Purificado | | | |
| | TA98 | | TA100 | | TA98 | | TA100 | |
| | SEM S9 | COM S9 | SEM S9 | COM S9 | SEM S9 | COM S9 | SEM S9 | COM S9 |
| C. N. (0) | 44,0 ± 3,5 | 52,8 ± 4,2 | 228,4 ± 11,7 | 249,2 ± 13,6 | 37,6 ± 4,8 | 43,6 ± 4,2 | 227,6 ± 4,3 | 220,5 ± 6,0 |
| 0,1 | 46,0 ± 5,7 | 55,5 ± 4,9 | - | - | 40,5 ± 0,7 | 42,3 ± 5,7 | 228,0 ± 6,1 | - |
| 0,5 | 59,0 ± 1,7* | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 | 63,7 ± 7,4* | 57,3 ± 5,0 | 267,7 ± 10,2 | - | 45,0 ± 8,5 | 50,3 ± 4,5 | 342,0 ± 16,1* | 234,0 ± 1,4 |
| 2,5 | 124,0 ± 14,1* | - | 313,7 ± 4,0* | - | - | - | - | - |
| 5 | 192,7 ± 11,0* | 80,7 ± 2,1* | 513,3 ± 4,2* | 257,0 ± 8,7 | 58,7 ± 4,2* | 65,3 ± 5,5* | 488,33 ± 30,1* | 240,0 ± 14,1 |
| 7,5 | - | - | 591,3 ± 15,5* | - | - | - | - | - |
| 10 | 344,0 ± 8,2* | 101,3 ± 3,5* | 878,0 ± 13,1* | - | 91,7 ± 10,5* | 72,3 ± 2,5* | 758,7 ± 35,8* | 234,5 ± 13,4 |
| 20 | - | - | 963,0 ± 9,9* | - | - | - | - | - |
| 25 | - | 180,5 ± 6,4* | - | 282,0 ± 11,3 | 188,5 ± 7,8* | 114,7 ± 21,0* | - | - |
| 50 | - | - | - | 299,7 ± 1,5* | 307,7 ± 19,1* | 162,7 ± 21,5* | 866,5 ± 17,7* | 282,0 ± 11,3* |
| 100 | - | - | - | 430,3 ± 1,5* | 509,7 ± 5,0* | - | - | 340,0 ± 28,3* |
| 200 | - | - | - | 700,0 ± 5,7* | - | - | - | - |
| 250 | - | - | - | 746,3 ± 44,5* | - | - | - | - |
| C. P. | 380,0 ± 28,3[a] | 1240,0 ± 56,6[b] | 2223,0 ± 60,1[a] | 2380,5 ± 43,1[b] | 416,0 ± 15,6[a] | 1166,0 ± 93,3[b] | 2055,0 ± 106,1[a] | 2165,0 ± 205,1[b] |
| Pot. Mut. (rev/µg) | 29,94 | 5,04 | 34,44 | 1,02 | 5,05 | 2,53 | 117,01 | 1,14 |

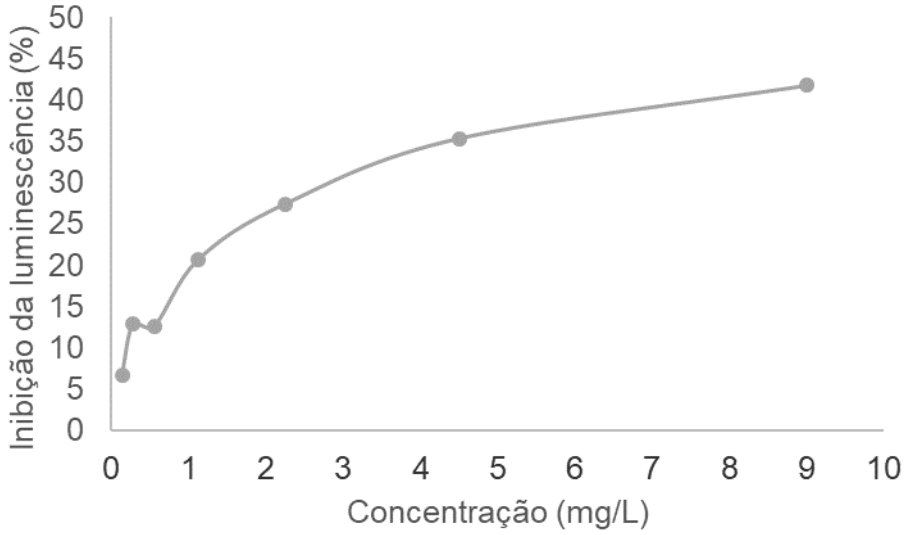
C. N.: Controle negativo
C. P.: Controle positivo
Pot. Mut.: Potência mutagênica
-: concentração não testada
[a]: óxido de 4 nitroquinolina (0,05 µg/µL)
[b]: 2 aminoantraceno (0,25 µg/ µL)
*: $p<0,05$

## 4.4 Disperse Red 78

### 4.4.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

O corante DR 78 causou toxicidade aguda na bactéria marinha *Vibrio fischeri*, reduzindo 20% da luminescência na concentração de 1,17 mg/L (Figura 28).

Figura 28 - Porcentagem de inibição da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri* após exposição por 15 minutos ao corante Disperse Red 78




### 4.4.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

O corante Disperse Red 78, em meio ASTM, induziu imobilidade em 50% dos organismos expostos na concentração de 0,025 mg/L (Tabela 14).

Tabela 14 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 78 por 48 horas em meio ASTM e valor de $CE_{50}$ com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber.

| Disperse Red 78 | Número de organismos imóveis | | | | Imobilidade | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Réplicas | | | | | |
| Concentração (mg/L) | 1 | 2 | 3 | 4 | Total | Porcentagem (%) |
| Controle (meio ASTM) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| Controle do solvente | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,01 | 2 | 1 | 1 | 0 | 4/20 | 20 |
| 0,025 | 2 | 1 | 3 | 3 | 9/20 | 45 |
| 0,05 | 4 | 5 | 5 | 4 | 18/20 | 90 |
| 0,075 | 5 | 5 | 5 | 3 | 18/20 | 90 |
| 0,10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 20/20 | 100 |
| 0,25 | 5 | 5 | 5 | 5 | 20/20 | 100 |
| $CE_{50}$ 48h: 0,025 (0,017-0,033) mg/L | | | | | | |

Em meio MS, o corante Disperse Red 78 induziu imobilidade em 50% dos organismos expostos na concentração de 0,05 mg/L (Tabela 15).

Tabela 15 - Imobilidade de *Daphnia similis* expostas ao corante Disperse Red 78 por 48 horas em meio MS e valor de $CE_{50}$ com intervalos de confiança obtidos pelo programa Trimmed Spearman Karber

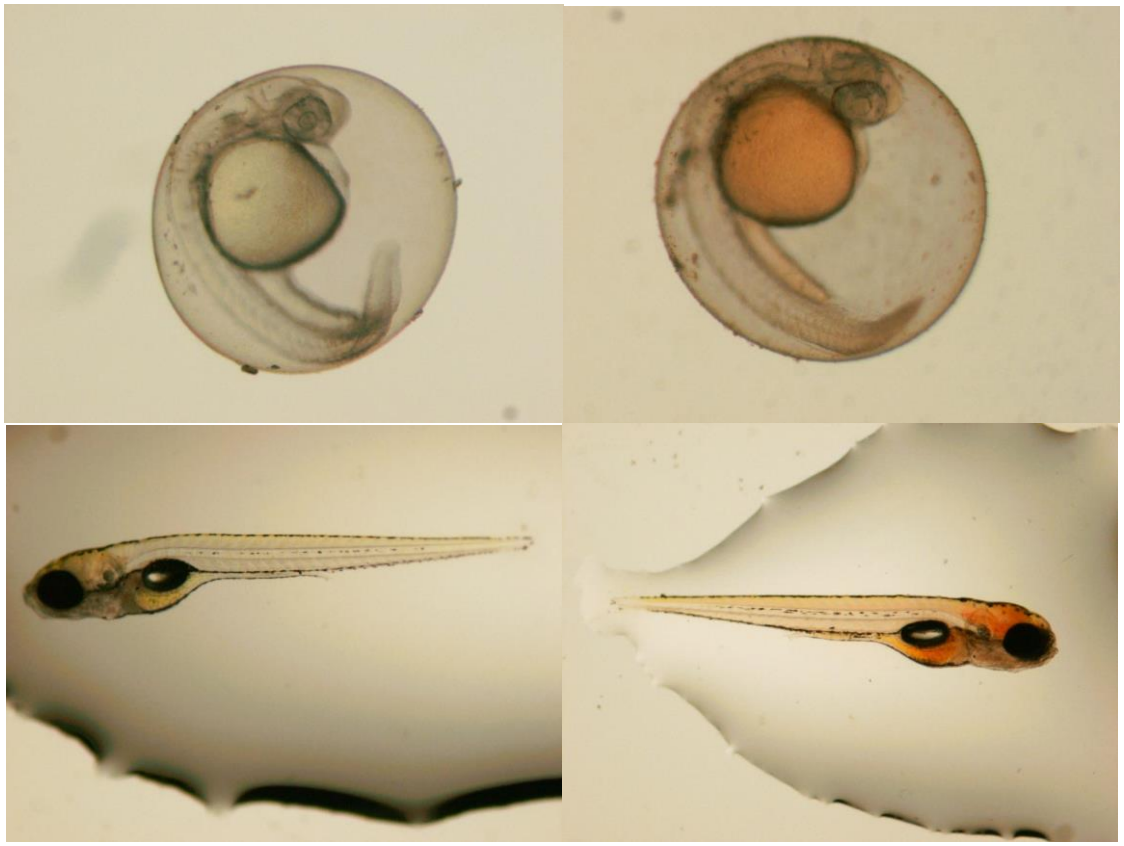
| Disperse Red 78 | Número de organismos imóveis | | | | Imobilidade | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Réplicas | | | | | |
| Concentração (mg/L) | 1 | 2 | 3 | 4 | Total | Porcentagem (%) |
| Controle (0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| Controle do solvente | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0,02 | 0 | 2 | 3 | 1 | 6/20 | 30 |
| 0,04 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8/20 | 40 |
| 0,08 | 5 | 3 | 4 | 3 | 15/20 | 75 |
| 0,1 | 5 | 5 | 3 | 3 | 16/20 | 80 |
| 1,0 | 5 | 5 | 4 | 5 | 19/20 | 95 |
| $CE_{50}$ 48h: 0,05 (0,03-0,07) mg/L | | | | | | |

De acordo com os resultados obtidos para *Daphnia similis* os corantes têxteis DR 73 e DR 78 podem ser classificados como extremamente tóxicos, pois apresentam $CE_{50}$ 48h menor que 1 mg/L (BAE; FREEMAN, 2007).

### 4.4.3 Ensaio com as formas iniciais de *Danio rerio*

O corante Disperse Red 78 não induziu letalidade, subletalidade e teratogenicidade em nenhuma das condições testadas, mesmo sendo muito absorvido pelos organismos, como pode ser observado na Figura 29.

Figura 29 - Comparação entre um organismo não exposto ao corante Disperse red 78 (esquerda) e exposto à 5 mg/L do corante Disperse Red 78 (direita) por 24 e 144 horas. (Amplificação de 4X nas fotografias superiores e 3X nas fotografias inferiores)



### 4.4.4 Avaliação do comportamento de larvas de *Danio rerio*

O corante Disperse Red 78 alterou a distância total de natação em todas as condições avaliadas, registrando-se um aumento na distância na menor concentração (0,01 mg/L) e uma redução nas demais concentrações testadas no ciclo claro. No entanto, no ciclo escuro o corante causou um aumento da distância na concentração de 0,01 e 0,3 mg/L e posteriormente uma redução nas

concentrações de 0,6 e 1,25 mg/L. Para o tempo total de natação, o corante aumentou o tempo na menor concentração avaliada (0,01 mg/L) tanto no ciclo claro quanto escuro e reduziu este tempo nas concentrações de 0,6 e 1,25 mg/L no ciclo claro, diferindo do ciclo escuro que causou redução do tempo desde a concentração de 0,3 mg/L (Figuras 30 e 31).

Figura 30 - Distância total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 78 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle

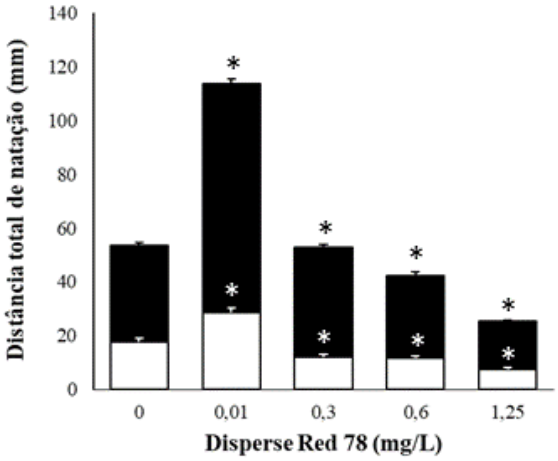
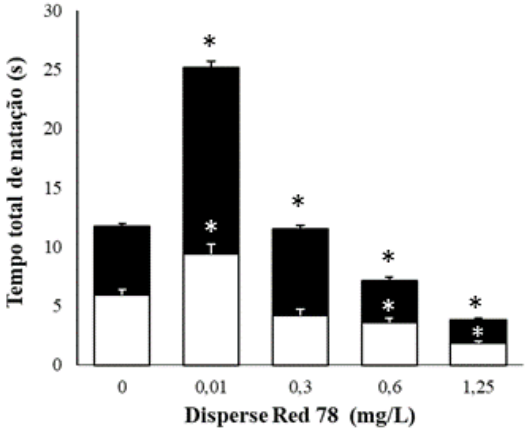



Figura 31 - Tempo total de natação de larvas de *Danio rerio* expostas ao corante Disperse Red 78 no segundo ciclo de 10 minutos no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). Os valores representam a média ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparado com o grupo controle

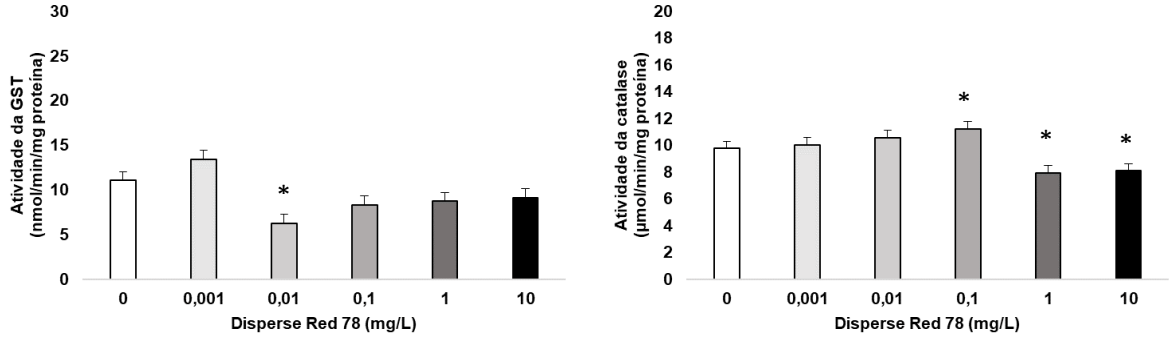


### 4.4.5 Biomarcadores Bioquímicos

#### 4.4.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxificação

O corante Disperse Red 78 reduziu a atividade da glutationa S-transferase na concentração de 0,01 mg/L, assim como aumentou a atividade da catalase na concentração de 0,1 mg/L e posteriormente reduziu esta atividade nas concentrações de 1 e 10 mg/L (Figura 32).

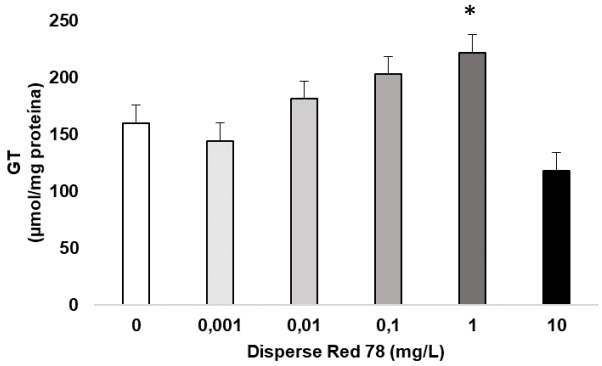
Figura 32 - Atividade das enzimas glutationa S-transferase (esquerda) e catalase (direita) em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




#### 4.4.5.2 Níveis de antioxidante não enzimático

O corante Disperse Red 78 aumentou os níveis de glutationa total na concentração de 1 mg/L (Figura 33).

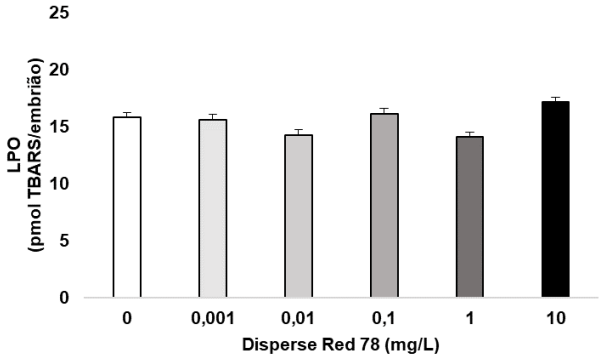
Figura 33 - Níveis de Glutationa Total em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05



#### 4.4.5.3 Peroxidação lipídica

O corante Disperse Red 78 não induziu peroxidação lipídica em nenhuma condição avaliada (Figura 34).

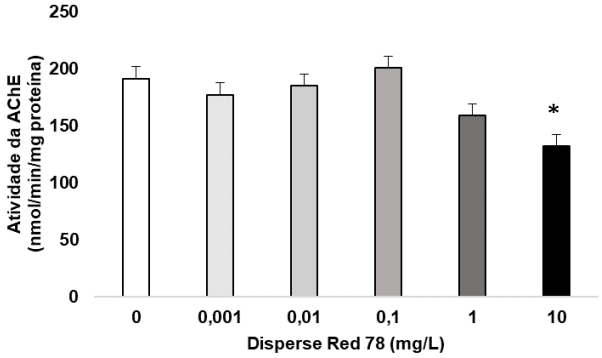
Figura 34 - Níveis de peroxidação lipídica em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




#### 4.4.5.4 Acetilcolinesterase

O corante Disperse Red 78 reduziu a atividade da acetilcolinesterase na maior concentração avaliada, 10 mg/L (Figura 35).

Figura 35 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em embriões de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 78 por 96 horas. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05




### 4.4.6 Reservas e consumo de energia

#### 4.4.6.1 Energia disponível

O corante Disperse Red 78 foi capaz de alterar as frações de energia disponível, diminuindo a porcentagem de lipídeos e aumentando a porcentagem de

carboidratos e proteínas nos organismos expostos, consequentemente alterando a energia total disponível destes indivíduos (Tabela 16).

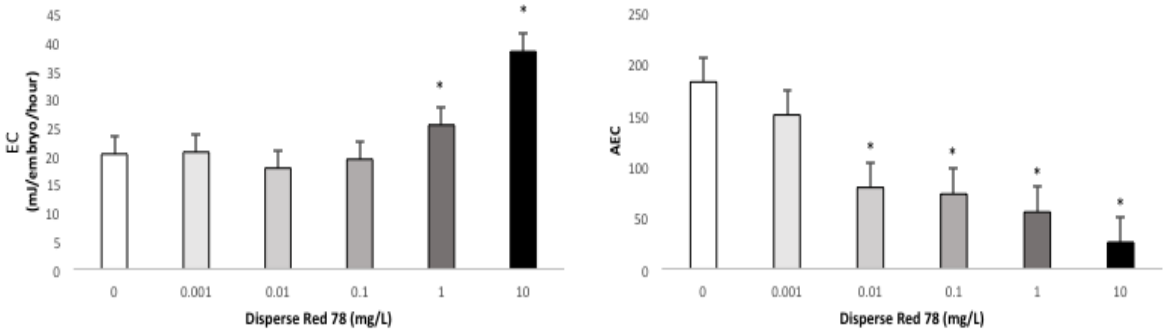
Tabela 16 - Frações de energia disponível e energia disponível total de larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 78. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05

| Tratamento | Frações de ED (%) | | | Ed total (mJ/embrião) |
|---|---|---|---|---|
| | Lipídeos | Carboidratos | Proteínas | |
| **DR78** | | | | |
| 0 | 96 ± 0,7 | 2.0 ± 0,3 | 1.9 ± 0,3 | 3660 ± 503 |
| 0,001 | 96 ± 1,1 | 2.1 ± 0,4 | 1.1 ± 0,2 | 2999 ± 457 |
| 0,01 | 94 ± 0,9 | 4.3 ± 0,4* | 2.6 ± 0,5 | 1391 ± 102* |
| 0,1 | 93 ± 0,8 | 5.0 ± 0,5* | 2.1 ± 0,4 | 1409 ± 97* |
| 1,0 | 90 ± 0,7* | 5.3 ± 0,3* | 4.6 ± 0,4* | 1384 ± 58* |
| 10 | 86 ± 1,9* | 6.7 ± 0,8* | 5.7 ± 0,8* | 987 ± 116* |

#### 4.4.6.2 Energia consumida e alocação de energia celular

O corante Disperse Red 78 aumentou a energia consumida nas concentrações de 1 e 10 mg/L. Este corante foi capaz também de reduzir significativamente a alocação de energia celular a partir da concentração de 0,01 mg/L (Figura 36).

Figura 36 - Energia consumida (esquerda) e alocação de enrgia celular (direita) em larvas de *Danio rerio* após exposição por 96 horas ao corante Disperse Red 73. Valores representados por média ± erro padrão (n=160). *Teste de Dunnett p<0,05



### 4.4.7 Ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

O corante Disperse Red 78 induziu alterações no DNA apenas na linhagem TA 98 na presença e ausência de S9 (Tabela 17).

Tabela 17 – Avaliação da mutagenicidade do corante Disperse Red 78 empregando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100

| Concentração (µg/placa) | Média do número de revertentes/placa ± desvio padrão | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Disperse Red 78 | | | |
| | TA98 | | TA100 | |
| | SEM S9 | COM S9 | SEM S9 | COM S9 |
| Controle negativo (0) | 44,0 ± 3,5 | 49,6 ± 5,5 | 205,4 ± 11,1 | 249,2 ± 13,6 |
| 0,5 | - | 43,7 ± 0,6 | 228,7 ± 17,9 | 230,3 ± 20,0 |
| 5 | 46,0 ± 2,6 | 59,5 ± 9,2 | 241,7 ± 27,5 | 243,0 ± 21,5 |
| 50 | 57,5 ± 0,7* | 69,0 ± 5,6* | 198,0 ± 26,5 | 256,3 ± 6,5 |
| 100 | - | - | - | 277,3 ± 7,6 |
| 250 | - | - | - | 239,3 ± 6,7 |
| 500 | 163,0 ± 7,8* | 68,0 ± 5,2* | 219,5 ± 34,6 | 256,7 ± 11,6 |
| 1000 | 247,0 ± 19,2* | 120,7 ± 8,1* | - | - |
| 2000 | 419,3 ± 33,1* | - | - | - |
| 5000 | - | - | 222,0 ± 17,1 | - |
| Controle positivo | 380 ± 28,3[a] | 1134,5 ± 20,5[b] | 2152,0 ± 36,8[a] | 2380,5 ± 43,1[b] |
| Potência mutagênica (rev/µg) | 0,21 | 0,42 | X | X |

-: concentração não testada
a: óxido de 4 nitroquinolina (0,05 µg/µL)
b: 2 aminoantraceno (0,25 µg/ µL)
X: não mutagênico

## 5. DISCUSSÃO

Uma síntese de todos os resultados obtidos nesta pesquisa está apresentada na Tabela 18, na qual podem ser observados todos os efeitos dos corantes Disperse Red 60, Disperse Red 73 e Disperse Red 78 sobre os diferentes organismos teste.

Tabela 18 - Síntese dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com os corantes dispersos neste trabalho

| | ***Vibrio fischeri*** | ***Daphnia similis*** | ***Danio rerio*** | | | | ***Salmonella thyphimurium*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Toxicidade aguda** | | | **Desenvolvimento (CENO E CEO)** | **Comportamento (claro e escuro)** | **Biomarcadores e reservas energéticas** | **Mutagenicidade** |
| **DR 60** | SE<br>até 9 mg/L | SE<br>até 20 mg/L | SE<br>até 4 mg/L | E.O. (0,5 e 1 mg/L) | DTN ↓ e TTN ↓<br>em quase todas as concentrações | GST ↓ (1 mg/L)<br>GT ↑ (0,01 e 0,1 mg/L) e ↓ (1 mg/L) | Não mutagênico |
| **DR 73** | $CE_{20}$ 15'<br>6,41 mg/L | $CE_{50}$ 48h<br>Meio ASTM:<br>0,19 mg/L<br><br>$CE_{50}$ 48h<br>Meio MS: 0,26 mg/L | SE<br>até 4 mg/L | N.I.B.N. (0,125 e 0,25 mg/L)<br>E.P. (0,25 e 0,5 mg/L)<br>ES (1 e 2 mg/L em 120 e 144 horas; 2 e 4 mg/L entre 48 e 96 horas)<br>S.V.A (0,5 e 1 mg/L em 120 e 144 horas; 1 e 2 mg/L entre 48 e 96 horas) | DTN ↑ e TTN ↑ nas três menores concentrações e ↓ na maior concentração | AChe ↑ (0,01 mg/L) e ↓ (1 mg/L)<br>CAT ↑ (0,001 mg/L)<br>Ec ↑ (1 mg/L) | Mutagênico<br>(Substituição de pares de base e deslocamento do quadro de leitura) |
| **DR 78** | $CE_{20}$ 15'<br>1,17 mg/L | $CE_{50}$ 48h<br>Meio ASTM:<br>0,025 mg/L<br><br>$CE_{50}$ 48h<br>Meio MS: 0,05 mg/L | SE<br>até 10 mg/L | SE<br>até 10 mg/L | DTN ↑ e TTN ↑ na primeira concentração e ↓ com o aumento da mesma | AChe ↓ (10 mg/L)<br>GST ↓ (0,01)<br>CAT ↑ (0,1 mg/L) e ↓ (1 e 10 mg/L)<br>GT ↑ (1 mg/L)<br>LIP ↓ CARB e PROT ↑<br>Ed ↓ (0,01 até 10 mg/L) Ec ↑ (1 e 10 mg/L)<br>AEC ↓ (a partir de 0,01 mg/L) | Mutagênico<br>(deslocamento do quadro de leitura) |

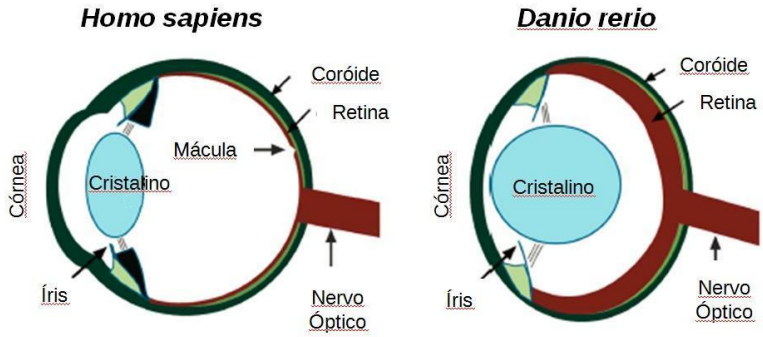
SE – sem efeito; E.O.: edema ocular; N.I.B.N.: não inflação da bexiga natatória; E.P.: edema do pericárdio; ES: escoliose; S.V.A.: saco vitelínico anormal; DTN – distância tota de natação; TTN – tempo total de natação; ↑ - aumentou; ↓ - diminuiu; GST – glutationa-s-transferase; GT – glutationa total; Ache – acetilcolinaesterase; CAT – catalase; LIP – lipídios; CARB – carboidratos; PROT – proteína; Ed: energia disponível; Ec – energia consumida; AEC – alocação de energia celular

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que o corante antraquinona Disperse Red 60 não causou toxicidade em *Vibrio fischeri*, assim como não pode ser classificado quanto a sua toxicidade para *Daphnia similis*, pois a solubilidade reduzida não permitiu avaliar até a concentração de 100 mg/L, recomendada pela OECD n° 202 (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004).

Este corante também não causou mortalidade significativa nos embriões de *Danio rerio*, porém induziu edema ocular nos organismos expostos a partir da concentração de 1,0 mg/L. A malformação dos olhos também foi relatada em embriões de sapo expostos a baixas concentrações do azo corante Disperse Yellow 7 (MATHIEU-DENONCOURT et al., 2014). Wang et al. (2012) também observaram esta alteração em embriões de *Danio rerio* expostos a bifenilas policloradas, alterando a morfologia e estrutura da retina, afetando principalmente células fotorreceptoras. Do ponto de vista ambiental, alterações oculares prejudicam o estímulo visual, podendo diminuir a alimentação, acasalamento e fuga dos predadores (DIAMANTE et al., 2017).

*Danio rerio* tem sido empregado com sucesso em estudos de toxicologia e desenvolvimento ocular (BILOTTA; SASZIK, 2001; GLASS; DAHM, 2004; GESTRI; LINK; NEUHAUSS, 2012; GLASS; ZOU et al., 2015). A principal vantagem desse modelo é a similaridade com o sistema visual humano, taxa de desenvolvimento do sistema ocular, além do tamanho e morfologia dos olhos (WANG et al., 2012; CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014). Desta forma, embora existam diferenças notáveis anatômicas entre os olhos humanos e de *zebrafish*, principalmente relacionadas ao formato das lentes e espaço entre estas e a retina, em geral os olhos desta espécie de peixe muito se assemelha aos olhos humanos (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014), como pode ser verificado na Figura 37. Assim, os ensaios com *zebrafish* são considerados de alto valor preditivo na avaliação da toxicidade ocular induzida por substâncias tóxicas, além de serem bons modelos para estudo de doenças oftalmológicas.

Figura 37 - Comparação entre o olho humano e o olho de *zebrafish*




Fonte: CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014 (modificado)

No entanto, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura associa a análise morfológica das alterações do sistema ocular com outras análises, como expressão gênica, análise histológica, formação de radicais livres, indução de morte celular, dentre outras, permitindo identificar as vias envolvidas no processo de malformação e extrapolar os resultados para o homem (HUANG et al., 2014; ZHOU et al., 2015; ZOU et al., 2015). Certamente, a inserção de novas metodologias é uma alternativa para identificarmos os mecanismos envolvidos na toxicidade de corante Disperse Red 60. Por exemplo, sabe-se que as vias que envolvem o ácido retinóico estão diretamente envolvidas na formação dos olhos, coração e esqueleto e que alguns contaminantes ambientais, como os corantes, são capazes de interferir nestas vias (LEE et al., 2004; MATHIEU-DENONCOURT et al., 2014).

Considerando que o corante causou alteração no desenvolvimento, buscou-se compreender se esta alteração poderia modificar os parâmetros de comportamento dos organismos, visto que é reconhecido que mudanças comportamentais podem estar relacionadas com alterações no desenvolvimento. Abe et al., (2017a), por exemplo, demonstraram que modificações no saco vitelíneo causadas pela exposição aos corantes Basic Red 51 e eritrostominoma afetam a atividade locomotora de larvas de *Danio rerio*.

O corante Disperse Red 60 reduziu a atividade locomotora, tempo e distância de natação, nos organismos expostos. A redução desta atividade também já foi observada em *zebrafish* expostos a carbamazepina e gemfibrozil ANDRADE et al., 2016; HENRIQUES et al., 2016).

Os ensaios de comportamento têm sido apontados como mais sensíveis comparados aos ensaios de desenvolvimento. Nossos resultados também mostraram que os ensaios de comportamento foram mais sensíveis, sendo que a alteração na atividade natatória foi detectada numa concentração até 100 vezes menor do que a concentração que causa efeito no desenvolvimento para o corante Disperse Red 60, evidenciando a importância da avaliação da atividade locomotora em organismos expostos a poluentes. Outros autores também identificaram a maior sensibilidade deste ensaio comparado ao FET com diferentes substâncias, como corantes, fármacos e fungicidas (ANDRADE et al., 2016; HENRIQUES et al., 2016; ABE et al. 2017a).

Em contrapartida, o corante Disperse Red 60 gerou poucas alterações nos biomarcadores bioquímicos avaliados. A falta de resposta na atividade da AChE sugere que este composto não possui potencial neurotóxico. Abe et al (2017c) avaliaram a atividade da acetilcolinesterase em larvas de *Danio rerio* expostas ao corante sintético Basic Red 51 e também observaram que este composto não possui potencial neurotóxico. Outros indicadores em que não foram observadas alterações são a atividade da catalase, os níveis de peroxidação lipídica e os parâmetros de energia. O corante natural eritrostominona após fotodegradação também não causou alterações nestes biomarcadores em larvas de *Danio rerio* (ABE et al., 2017b). No entanto, o sistema de detoxificação do organismo foi ativado em resposta a contaminação, evidenciado pelo aumento da glutationa total nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L. Esse aumento da glutationa total, observado nas menores concentrações, pode indicar que outras vias não analisadas de defesa antioxidantes, como a glutationa peroxidase (GPx) e a glutationa redutase (GR), foram ativadas como resposta do metabolismo dos organismos expostos ao corante, e ainda que a glutationa total tem papel importante no processo de detoxificação pelo corante Disperse Red 60. O aumento da glutationa total contribui na manutenção do estado redox celular, pois protege as células das espécies reativas de oxigênio e radicais livres (DOYOTTE et al., 1997; SEN, 1997). O aumento da glutationa total também foi observada no inseto *Sericostoma vittatum* expostos a filtros UV (CAMPOS et al., 2017). Já na maior concentração (1,0 mg/L), a diminuição da atividade da GST e níveis de glutationa total podem ter ocorrido pela incapacidade do organismo responder frente ao estresse devido ao seu estado debilitado.

Diferentemente do corante Disperse Red 60, o azo corante Disperse Red 73 reduziu a luminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Outros autores também verificaram efeitos de corantes sobre este organismo. Wang et al. (2002), por exemplo, avaliaram onze azo corantes e observaram $CE_{20}$ de 5 - 600,00 mg/L. Gottlieb et al. (2003) avaliaram seis azo corantes, os quais apresentaram $CE_{50}$ entre 15,70 e 71,00 mg/L. Novotný et al. (2006) avaliaram dois azo corantes, Reactive Orange 16 e Congo Red, e dois corantes antraquinona, Remazol Brilliant Blue R e Disperse Blue 3, e identificaram valores de $CE_{50}$ entre 94,0 e 1623,0 mg/L, sendo os corantes do tipo antraquinona mais tóxicos para *V. fischeri*. Leme et al (2015) avaliaram a toxicidade do azo corante Reactive Red 120 e do corante antraquinona Reactive Blue para *V. fischeri* e encontraram valores de $CE_{50}$ de 120,27 e 751,1 mg/L, respectivamente. Logo, verifica-se que não há uma relação determinante entre a classe de corante e sua toxicidade.

Quanto a toxicidade aguda ao microcrustáceo *Daphnia similis*, o corante Disperse Red 73 causou imobilidade em baixas concentrações neste organismo e foi classificado como extremamente tóxico ou muito tóxico para a vida aquática (CE50 < 1 mg/L) (BAE; FREEMAN, 2007; GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS, 2007).

O corante Disperse Red 73 não causou mortalidade significativa nos embriões e larvas de *zebrafish* expostos, porém reduziu a inflação da bexiga natatória, induziu edemas cardíacos, escoliose e anormalidades no saco vitelínico em embriões de *Danio rerio*. A inflação da bexiga natatória é um importante *endpoint* para avaliação de compostos, pois esse órgão é utilizado para flutuação, permitindo que os organismos permaneçam na coluna d'água com gasto mínimo de energia. Além disso, o controle de gás na bexiga possibilita que os organismos desçam ou subam na coluna d'água, sendo que este controle é mediado pela acetilcolina. A não inflação da bexiga natatória na fase larval tem consequências deletérias para a sobrevivência de *Danio rerio* (FINNEY et al., 2006; ROBERTSON et al., 2007), pois essa alteração pode modificar os padrões de comportamento, tais como alimentação, predação e reprodução, diminuindo a sobrevivência, especialmente em habitats naturais onde os recursos alimentares são limitados (HAGENAARS et al., 2014; VILLENEUVE et al., 2014).

Organismos que não conseguem inflar a bexiga natatória tem maior gasto de energia para permanecerem na coluna d'água. Logo, o desenvolvimento pode ser

comprometido, podendo reduzir o tamanho e velocidade de natação do organismo (LINDSEY; SMITH; CROLL, 2010; HAGENAARS et al., 2014). Czesny, Graeb e Dettmers (2005), por exemplo, observaram que larvas de *Perca flavescens* com bexigas não infladas apresentaram menores taxas de crescimento, além de maior predação, demanda metabólica e vulnerabilidade. Dessa forma, fatores que afetam a bexiga natatória podem acarretar em danos populacionais.

Além disso, estudos recentes têm mostrado que a organogênese da bexiga natatória de *zebrafish* e os pulmões de mamíferos compartilham origens muito semelhantes, sendo que a maior diferença entre esses dois órgãos é a ramificação em alvéolos, característica dos pulmões. Adicionalmente, diversas proteínas são expressas de forma semelhante em ambos os órgãos (WINATA et al., 2009; ZHENG et al., 2011).

Como dito anteriormente, o corante Disperse Red 73 induziu edemas cardíacos e esses edemas podem estar associados a vazamentos nos vasos endoteliais resultando em disfunções no órgão ou ainda a um padrão de sinalização incorreta de cálcio, sendo que compostos lipofílicos possuem maior capacidade de alterar este padrão devido a sua afinidade por membranas fosfolipídicas (ALVES et al., 2004; HALLARE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; ABE et al., 2017a). Este tipo de edema já foi relatado em *zebrafish* expostos a poluentes orgânicos, metais e nanopartículas (LI et al., 2017).

Muitos autores sugerem o *zebrafish* como modelo animal para avaliação do risco cardiovascular *in vivo*, principalmente pela transparência que facilita a contagem dos batimentos cardíacos, podendo inferir sobre ritmo e frequência cardíaca, além da visualização de edemas. O coração é o primeiro órgão a se desenvolver no peixe zebra, pois após 22 horas pós-fertilização e em aproximadamente 48 horas o sistema cardiovascular é totalmente funcional (THISSE; ZON, 2002; LIU et al., 2017). Apesar de *zebrafish* apresentar apenas um átrio e um ventrículo, diferentemente dos mamíferos que apresentam dois átrios e dois ventrículos, o desenvolvimento cardiovascular é muito semelhante entre estes dois grupos (QUAIFE; WATSON; CHICO, 2012; LI et al., 2014).

Outra alteração observada após a exposição ao corante Disperse Red 73 foi a escoliose. As alterações na coluna vertebral podem estar relacionadas com a depleção ou desregulação de íons cálcio e fósforo ou com redução de miosina, proteína importante para o desenvolvimento normal da coluna (CHENG et al., 2000;

OLIVEIRA et al., 2009). A escoliose também já foi reportada em organismos expostos a nanopartículas de prata (ABRAMENKO et al., 2017).

O saco vitelínico apresenta grande importância no fornecimento de energia para o embrião e larva, além de atuar na secreção de fatores de crescimento, proteínas e citocinas. Logo, a alteração neste órgão pode acarretar em prejuízos ao organismo, tal como modificações no crescimento (HERBOMEL et al., 1999; STRAHLE et al. 2012; ABE et al., 2017a). Edemas cardíacos, de saco vitelínico e alterações esqueléticas também foram observadas em embriões e larvas expostos ao triclosan, substância bastante comum em produtos de higiene pessoal (OLIVEIRA et al., 2009).

Com relação ao comportamento de *zebrafish* expostos ao corante Disperse Red 73, podemos observar uma relação dose-resposta no modelo “U” invertido, pois em baixas concentrações houve aumento da distância e tempo de natação, enquanto em concentrações elevadas houve redução destes parâmetros. Irons et al. (2010) também reportaram que baixas doses de álcool e D-anfetamina causam hiperatividade, enquanto altas concentrações resultam em hipoatividade em *zebrafish*.

A redução da atividade locomotora nas larvas expostas ao corante Disperse Red 73 pode estar associado ao processo de não inflação da bexiga natatória induzido por este corante, pois se reconhece que a não inflação deste órgão pode acarretar em prejuízos na atividade de locomoção (STRAHLE et al., 2012).

Nos organismos expostos ao corante Disperse Red 73, a atividade da AChE aumentou na concentração de 0,01 mg/L e diminuiu na concentração de 1 mg/L. O aumento na concentração de acetilcolinesterase em baixas concentrações pode ser explicado como um mecanismo compensatório após alteração na homeostasia (CALABRESE; BALDWIN, 2003). Com isso, pode-se considerar que o Disperse Red 73 é potencialmente neurotóxico a *Danio rerio*. Andrade et al. (2016) relataram um aumento na atividade da acetilcolinesterase em embriões de *Danio rerio* expostos a carbamazepina e associaram este aumento com mecanismos de apoptose. Este aumento também foi observado em *Daphnia magna* exposta ao cádmio e carbamato propoxur e no crustáceo *Palaemon serratus* exposto ao antraceno (JEMEC et al., 2003; GRAVATO et al., 2014). Já a redução da atividade de acetilcolinesterase também foi relatada em larvas de *Danio rerio* expostas ao corante ertitrostominoma e em adultos expostos ao praguicida endosulfan (ABE et al., 2017c; KIM et al.,

2018). Este corante também aumentou a atividade da enzima antioxidante catalase e os níveis de energia total consumida. Esta resposta mostra que houve ativação no metabolismo de detoxificação do organismo produzindo espécies reativas, as quais foram suficientemente combatidas pela atividade da catalase, como sugere a falta de resposta no indicador de estresse oxidativo testado (LPO). Oropesa et al. (2017) também relataram o aumento na atividade da catalase e ausência de peroxidação lipídica em *Daphnia magna* expostas a efluentes após tratamento.

O corante Disperse Red 73 também aumentou o consumo energético dos embriões (EC), como visto no ensaio empregando o sistema transportador de elétrons (ETS). O aumento da atividade ETS está associado à ativação da cadeia respiratória decorrente da maior necessidade de energia para os processos de desintoxicação (CHOI et al., 2001). Nossos resultados apontam para esta correlação com o processo de desintoxicação, visto que biomarcadores bioquímicos foram alterados por este corante. O aumento na atividade ETS também foi relatado para *Chironomus riparius* expostos a clorantranilipole (RODRIGUES et al., 2015). Logo, podemos sugerir que o aumento do metabolismo induzido por este corante pode reduzir a energia disponível para crescimento e reprodução.

O corante Disperse Red 73, na forma comercial e purificada, foi capaz de induzir mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* pelo mecanismo de deslocamento do quadro de leitura, identificado pela linhagem TA98 e substituição de pares de base, detectado pela linhagem TA100. O corante Disperse Red 73 comercial apresentou mutagenicidade moderada (10-100 rev/µg) e baixa (1-10 rev/µg), na ausência e presença de ativação metabólica para ambas as linhagens, ao passo que o corante Disperse Red 73 purificado induziu mutagenicidade baixa para linhagem TA 98 na ausência e presença de S9 e para TA 100 na presença de metabolização e alta (100-1000 rev/µg) para a linhagem TA 100 na ausência de metabolização (CLAXTON et al., 1991a; CLAXTON et al., 1991b; UMBUZEIRO et al., 2005). É possível observar que nos ensaios com o corante Disperse Red 73 purificado houve uma redução de 6 e 2 vezes (ausência e presença de ativação metabólica, respectivamente) da mutagenicidade para a linhagem TA 98, evidenciando que as alterações no DNA que ocorreram com a linhagem TA 98 expostas ao corante comercial foram devidas principalmente às impurezas do corante Disperse Red 73, ou seja, as impurezas são responsáveis em maior parte pelo deslocamento do quadro de leitura observado. No entanto, também podemos

observar que após a purificação houve um aumento de 3,4 vezes na mutagenicidade para a linhagem TA 100 na ausência de metabolização exógena, indicando que o corante é o responsável por induzir substituição de pares de base. Não houve alteração na mutagenicidade encontrada para a linhagem TA 100 na presença de metabolização exógena.

As impurezas presentes em corantes compreendem principalmente os agentes dispersantes e corantes secundários e os mesmos podem contribuir na mutagenicidade da amostra. Vacchi et al. (2013) realizaram a identificação dos compostos presentes no corante comercial Disperse Red 1, avaliaram a mutagenicidade de cada fração encontrada e observaram que as impurezas presentes na amostra contribuíram com cerca de 50% da mutagenicidade do corante. No entanto, também foi possível observar neste trabalho que os 50% restante da mutagenicidade foi atribuída ao próprio corante. Dessa forma, podemos afirmar que tanto as impurezas quanto o corante original podem ser responsáveis pela mutagenicidade.

Verifica-se ainda que a ativação metabólica reduziu a potência mutagênica do corante DR 73. Possivelmente os produtos gerados após a ação das isoformas do citocromo P450 foram menos reativos com o DNA, o que não indica a detoxificação do composto, pois apenas o *endpoint* mutagenicidade foi avaliado. Os corantes têxteis Disperse Red 1, Disperse Red 13 e Disperse Orange 1 também tiveram suas potências mutagênicas reduzidas após serem metabolizados (FERRAZ et al., 2011; FERRAZ et al., 2013). Os compostos nitroaromáticos, como os corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78, frequentemente induzem mutagenicidade direta, ou seja, apresentam atividade na ausência de ativação metabólica (JOSEPHY et al. 2016).

A inserção de ensaios com as linhagens YG1041 e YG1042, derivadas das linhagens TA98 e TA100, respectivamente, podem ser uma importante ferramenta na avaliação do corante Disperse Red 73, pois apresentam elevada produção das enzimas nitro e acetiltransferase, aumentando a sensibilidade para derivados nitro de compostos orgânicos (HAGIWARA et al., 1993).

A elevada mutagenicidade encontrada para o corante Disperse Red 73 possivelmente está associada com a presença do derivado cianobenzeno, 2-ciano-4-nitroanilina (CNNA). Josephy et al. (2016) demonstraram que este composto apresenta alta capacidade de indução de deslocamento do quadro de leitura. Os autores avaliaram a mutagenicidade empregando as linhagens de *Salmonella*

*typhimurium* TA98, TA98NR (linhagem derivada da TA98, porém com baixa atividade de nitroredutase) e YG1024 (linhagem que apresenta alta atividade de N-acetiltransferase de arilamina) e observaram uma maior resposta para a linhagem YG1024, seguido pela linhagem TA 98 e TA98NR, como esperado para compostos nitroaromáticos. Cabe ressaltar que o derivado CNNA está presente em outros corantes dispersos, como o Disperse Violet 33, aumentando a preocupação com estes compostos (JOSEPHY et al., 2016).

Assim como o corante Disperse Red 73, o corante Disperse Red 78 reduziu a luminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri* e causou imobilidade em *Daphnia similis*, sendo extremamente tóxico ou muito tóxico para a vida aquática (CE50 < 1 mg/L) (BAE; FREEMAN, 2007; GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS, 2007).

As características lipofílicas dos corantes dispersos podem facilitar a absorção e indução de danos. Yu et al. (2015) avaliaram a toxicidade do corante Disperse Red 1 e observaram que *Daphnia similis* absorve grande quantidade do corante. Ferraz et al. (2011) avaliaram a ecotoxicidade de dois azo corantes dispersos, Disperse Red 1 e Disperse Red 13, e concluíram que ambos são muito tóxicos para a vida aquática, pois apresentam $CE_{50}$ de 0,127 e 0,019 mg/L, respectivamente. Croce et al. (2017) avaliaram a toxicidade de 42 corantes de diferentes classes para *Daphnia magna* e observaram que 34 compostos apresentaram $CE_{50}$ maior que 100 mg/L e não houve uma correlação significativa entre a estrutura química e a toxicidade dos corantes. Segundo Olgaard et al. (1998), outras características têm importante papel na toxicidade, tal como o tipo de formulação, incluindo impurezas, interações e inibição de luz.

Se analisarmos a estrutura química dos corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78 pode-se observar que a única diferença entre eles é a presença de um grupamento ciano (CN) ao invés de um átomo de cloro (Cl) na posição 2 do primeiro anel aromático no corante Disperse Red 73 e no corante Disperse Red 78, respectivamente. Essa pequena diferença foi capaz de alterar a ecotoxicidade observada, sendo que o corante Disperse Red 78 foi cerca de 6 vezes mais tóxico comparado ao corante Disperse Red 73. Ferraz et al. (2011) avaliaram dois corantes têxteis e também verificaram que a inserção de um átomo de cloro na posição 2 do primeiro anel aromático do corante Disperse Red 1, dando origem ao Disperse Red 13, foi capaz de elevar a toxicidade em *Daphnia similis*. No entanto, também não

podemos descartar a possibilidade de a diferença de toxicidade ser atribuída às impurezas da amostra e não apenas à inserção do cloro na estrutura química, visto que ambos corantes apresentam uma taxa de impureza entre 20 e 40%.

Como podemos verificar, o microcrustáceo *Daphnia similis* foi bastante sensível aos corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78. Os invertebrados têm sido apontados como organismos bastante sensíveis e possíveis substitutos de ratos e camundongos em pesquisas ecotoxicológicas (LIU et al., 2007). Estudos apontaram uma correlação entre valores de $CE_{50}$ para *Daphnia magna* e $DL_{50}$ para ratos expostos a diferentes substâncias químicas (KHANGAROT; RAY; CHANDRA, 1987; GUILHERMINO et al., 2000). As principais vantagens de utilizar invertebrados em triagens é a redução do número de animais nos ensaios de toxicidade e presença de sistema de metabolização, que pode estar ausente em ensaios *in vitro* (LIU et al., 2007).

Analisando a toxicidade encontrada nos ensaios com *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* observou-se que os ensaios com microcrustáceo foram mais sensíveis que o ensaio com a bactéria. Da mesma forma, Barata et al. (2008) avaliaram misturas contendo compostos de origem industrial empregando diferentes bioensaios e observaram que ensaios com *Daphnia magna* foram mais sensíveis que outros, como o ensaio com *Vibrio fischeri*. Liu et al. (2002) também compararam a toxicidade de diferentes tipos de efluentes para as espécies *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*. Ao final do trabalho verificaram que *Daphnia* se mostrou mais sensível nos ensaios. No entanto, houve efluentes tóxicos apenas para uma espécie, evidenciando a importância de se utilizar mais de um organismo teste na avaliação da toxicidade.

A maior sensibilidade de *Daphnia* comparada com *Vibrio fischeri* pode estar relacionada com a ingestão de contaminantes, visto que organismos como microcrustáceos e peixes, durante os bioensaios, podem ingerir mais substâncias, comparado a bactérias (BARATA et al., 2008). No entanto, a comparação direta da sensibilidade de *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* deve ser realizada com muita cautela, uma vez que os *endpoints* analisados são distintos e há diferença na complexidade dos organismos teste.

Diferentemente dos corantes dispersos, os corantes reativos normalmente apresentam baixa ou nenhuma toxicidade para *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*. Segundo Novotný et al. (2006), alguns corantes azo ácidos, básicos e diretos podem

ser tóxicos para peixes, crustáceos, algas e bactérias, enquanto que corantes azo reativos não são tóxicos para organismos aquáticos e apresentam valores de $CE_{50}$ > 100 mg/L. De acordo com Leme et al. (2015), os corantes têxteis Reactive Red 120 e Reactive Blue 19 também não são tóxicos para *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*. Dessa forma, os corantes reativos podem ser uma alternativa ao uso de corantes mais tóxicos como os dispersos.

O corante Disperse Red 78 não causou mortalidade e malformações nos embriões e larvas de *Danio rerio* expostos ao corante. No entanto, induziu alterações do comportamento no mesmo padrão que o corante Disperse Red 73, modelo “U” invertido, sendo a atividade locomotora aumentada em baixas concentrações e reduzida em concentrações elevadas. O aumento desta atividade também foi relatado em larvas de *Danio rerio* expostas a baixas concentrações dos praguicidas glifosato e diquat (ZHANG et al., 2017; WANG et al., 2018).

Neste trabalho foram observadas alterações no comportamento em concentrações muito inferiores às concentrações que causaram alteração no desenvolvimento para os corantes Disperse Red 60 e Disperse Red 73, assim como foram observadas modificações no comportamento de organismos expostos ao corante Disperse Red 78, sendo que este corante não induziu nenhuma alteração no desenvolvimento nas condições avaliadas. Logo, outros fatores ou mecanismos, além do desenvolvimento, possivelmente estavam envolvidos na modificação do comportamento dos organismos expostos.

O corante Disperse Red 78 foi o que mais provocou alterações no metabolismo de detoxificação e defesa antioxidante dos biomarcadores analisados em *Danio rerio*. A atividade da AChE diminuiu na maior concentração testada (10 mg/L), mostrando um potencial efeito neurotóxico deste composto apenas em concentrações elevadas. Adicionalmente, a atividade da enzima glutationa S-transferase foi reduzida, assim como da catalase. Essa redução sugere que o corante Disperse Red 78 pode levar ao estresse oxidativo, pois há alterações nas defesas antioxidantes. ZHANG et al. (2012) observaram redução da atividade da GST em adultos de *Danio rerio* expostos a efluente, assim como já foi relatado redução na atividade da catalase em machos de *Danio rerio* expostos a microcistina e nitrito (LIN et al., 2018).

Em condições de estresse também podem ocorrer alterações nos biomarcadores energéticos devido à indução do sistema de detoxificação,

modificando as reservas energéticas, energia consumida e alocação de energia celular (SOKOLOVA et al., 2012). Como podemos observar, os lipídeos foram a principal reserva energética dos embriões devido a grande quantidade deste constituinte no vitelo nesta fase da vida, diferentemente dos adultos que apresentam maior quantidade de proteínas como conteúdo energético (SMOLDERS et al., 2003; FRAHRER et al., 2016). O corante Disperse Red 78 reduziu a fração de lipídios dos organismos nas concentrações de 1,0 e 10,0 mg/L, o que possivelmente ocorreu porque os lipídios são a primeira reserva a ser mobilizada pelo organismo quando expostos a contaminantes (DE COEN; JANSSEN, 1997). Este corante também aumentou a fração de carboidratos nas concentrações de 1,0 e 10,0 mg/L e de proteínas na concentração de 10,0 mg/L. Este aumento também foi observado para *Daphnia magna* exposta a diferentes contaminantes e para o isópodo *Porcellionides pruinosus* exposto ao níquel (DE COEN; JANSSEN, 2003; FERREIRA et al., 2015). A hipótese proposta por alguns autores para o aumento de proteínas está relacionada com a indução de síntese proteica utilizada no mecanismo de detoxificação (SMOLDERS et al., 2003; NOVAIS; AMORIM, 2013). Smolders, De Boeck e Blust também identificaram o aumento nas frações de proteínas em *Danio rerio* expostos a efluente.

O corante Disperse Red 78 também aumentou o consumo energético dos embriões (EC) e reduziu a alocação de energia celular, essa redução pode ser resultante do aumento da energia consumida ou diminuição das reservas energéticas, ou ainda pela combinação dos dois parâmetros, como foi observado para o corante Disperse Red 78.

O corante Disperse Red 78 induziu mutagenicidade extremamente baixa, 0,1-1 rev/µg (CLAXTON et al., 1991a; CLAXTON et al., 1991b; UMBUZEIRO et al., 2005). Esse corante induziu apenas deslocamento do quadro de leitura nos organismos expostos, mecanismo detectado pela linhagem TA 98. Apesar da baixa potência mutagênica do corante Disperse Red 78, é importante ressaltar que não há um limiar de tolerância para compostos mutagênicos (CHASIN; AZEVEDO, 2003).

Conforme já citado, a estrutura química do Disperse Red 73 e Disperse Red 78 são muito semelhantes, diferindo apenas na posição 2 do primeiro anel. No entanto, essa diferença alterou a mutagenicidade. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos. De acordo com a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2006), compostos com cianeto podem ser

mutagênicos e a metabolização diminui a potência mutagênica, como observado neste trabalho. Segundo Ferraz et al. (2011) a presença do cloro nesta mesma posição da estrutura química do corante Disperse Red 13 diminuiu significativamente a mutagenicidade comparado ao corante Disperse Red 1, que apresenta a mesma estrutura química, exceto o átomo de cloro. Uma possível explicação desta ocorrência é a diminuição da densidade eletrônica no grupamento azo e consequentemente menor reatividade com grupos nucleofílicos do DNA (LEVINE, 1985; FERRAZ et al., 2011). A toxicidade do corante é dependente da estrutura química e pequenas alterações na molécula podem modificar os efeitos causados, por isso é importante avaliar individualmente cada substância, como demonstrado para os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13; e Disperse Red 1 e Disperse Orange 1 (CHEQUER et al., 2009; FERRAZ et al., 2011; FERRAZ; GRANDO; OLIVEIRA, 2011).

Outra grande preocupação com os corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78 está relacionado à sua capacidade de formar aminas aromáticas após metabolização por sistemas biológicos. Segundo Franco et al. (2018) as reações de metabolização destes corantes ocorrem principalmente no grupo azo e nitro, indicando a redução destes grupamentos pelas enzimas do citocromo P-450. Neste estudo, os autores avaliaram a biotransformação *in vitro* dos corantes Disperse Red 73 e Disperse Red 78, identificando dois metabólitos formados para o corante DR73, sendo estes a 5-amino-2-((4-((2-cianoetil)(etil) amino) fenil)diazenil)benzonitrile e 2-(2-(4-((2-cianoetil)(etil)amino) fenil) hidrazinil)-5-nitrobenzonitrile e o metabólito 3-((4-((4-amino-2-clorofenil)diazenil) fenil)(etil)amino)propanenitrila para o corante DR78. Grupos químicos destas estruturas identificadas constam na classificação de substâncias perigosas para a saúde humana, proposta pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Além da metabolização *in vitro*, os autores avaliaram os produtos formados após metabolização *in vivo* empregando *Escheria coli* e identificaram a formação de 3-((4-aminofenil)(etil)amino)propanitrila e 4-nitroanilina, sendo a última considerada tóxica para a saúde e meio ambiente. Já para o corante Disperse Red 78 houve a formação de 3-((4-aminofenil)(etil)amino)propanitrila e 2-cloro-4-nitroanilina, sendo o segundo produto considerado possivelmente carcinogênico para seres humanos segundo a IARC.

Os resultados obtidos no presente trabalho são preocupantes do ponto de vista ambiental, pois as concentrações testadas podem ser facilmente atingidas

considerando a estimativa de lançamento de 280.000 toneladas de corantes por ano no ambiente aquático, uma vez que essa grande quantidade lançada é devida principalmente à baixa fixação dos corantes às fibras tingidas (GUARATINI; ZANONI, 2000; MAAS; CHAUDHARI, 2005).

Adicionalmente, é importante considerar que devido às exigências do mercado consumidor em relação à robustez da cor nas fibras coloridas frente a diferentes processos, como transpiração, lavagem e exposição ao sol, as moléculas de corantes utilizadas são cada vez mais estáveis, aumentando o tempo de meia vida destes compostos no ambiente. Por exemplo, o tempo de meia vida da forma hidrolisada do corante Reactive Blue 19 é de 46 anos, sob pH 7,00 e 25°C (HAO; KIM; CHIANG, 2000), o que evidencia os riscos ambientais associados à presença dos corantes.

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa verifica-se que os corantes avaliados têm efeitos deletérios à biota aquática, os quais incluem alterações bioquímicas, comportamentais, no desenvolvimento e na sobrevivência das espécies. Dentro deste contexto, pode-se inferir que não somente alterações em níveis individuais e populacionais são esperadas, mas também em níveis de comunidades e ecossistemas. Salienta-se, portanto, a necessidade do estabelecimento de regulamentações mais efetivas na produção e liberação dos corantes, bem como no seu descarte nos efluentes, uma vez que estes acabam atingindo os ecossistemas aquáticos.

# 6 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 Spectometry***,* 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 naphthoflavoneon 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 rewiev. **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. **Curre nt 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.; TUSÏEK, 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-Karber method for stimating 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 andreproductive 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.; GIESSENB,W. J. V. D. A concise review of DNA damage chekpoints 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 toxicicity: comparative assessment with mouse system. **Acta Hidrochimica 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 swin 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. *Dar*T: 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 Stransferase 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 Poluttion 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 efluent: 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 *Sericostoma 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 bipyridylium 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 αA-crystallin in the development of the zebrafish embryonic lens. **Experimental Eye Research**, v. 138, p. 104-113, 2015.

# APÊNDICES

# APÊNDICE 1 - Resultados das análises estatísticas nos ensaios com *Danio rerio*

Tabela A: Valores de ANOVA calculados para ensaio FET com *Danio rerio* para o corante Diserse Red 60

| Parâmetro | hpf | ANOVA | |
|---|---|---|---|
| Edema Ocular | 96 | F(7,16)= 32,31 | p<0,0001 |
| | 120 | F(7,16)= 72,90 | p<0,0001 |
| | 144 | F(7,16)= 94,22 | p<0,0001 |

Tabela B: Valores de ANOVA calculados para ensaio FET com *Danio rerio* para o corante Diserse Red 73

| Parâmetro | hpf | ANOVA | |
|---|---|---|---|
| Bexiga natatória não inflada | 96 | F(7,16)= 36,10 | p<0,0001 |
| | 120 | F(7,16)= 118,5 | p<0,0001 |
| | 144 | F(7,16)= 107,1 | p<0,0001 |
| Edema do pericárdio | 48 | F(7,16)= 1172 | p<0,0001 |
| | 72 | F(7,16)= 144,9 | p<0,0001 |
| | 96 | F(7,16)= 144,9 | p<0,0001 |
| Escoliose | 48 | F(7,16)= 26,46 | p<0,0001 |
| | 72 | F(7,16)= 26,46 | p<0,0001 |
| | 96 | F(7,16)= 26,46 | p<0,0001 |
| | 120 | F(7,16)= 60,81 | p<0,0001 |
| | 144 | F(7,16)= 67,41 | p<0,0001 |
| Saco vitelínico anormal | 48 | F(7,16)= 131,4 | p<0,0001 |
| | 72 | F(7,16)= 148,1 | p<0,0001 |
| | 96 | F(7,16)= 148,1 | p<0,0001 |
| | 120 | F(7,16)= 105,8 | p<0,0001 |
| | 144 | F(7,16)= 105,8 | p<0,0001 |

Tabela C: Valores de ANOVA calculados para o ensaio de comportamento com *Danio rerio*

| Parâmetro | ANOVA | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | DR60 | | DR73 | | DR78 | |
| DTN claro | F(4,45)= 8,273 | p<0,0001 | F(4,45)= 22,64 | p<0,0001 | F(4,43)= 71,90 | p<0,0001 |
| DTN escuro | F(4,45)= 28,01 | p<0,0001 | F(4,45)= 74,72 | p<0,0001 | F(4,45)= 448,5 | p<0,0001 |
| TTN Claro | F(4,45)= 8,284 | p<0,0001 | F(4,45)= 18,45 | p<0,0001 | F(4,45)= 28,91 | p<0,0001 |
| TTN escuro | F(4,45)= 155,8 | p<0,0001 | F(4,45)= 81,32 | p<0,0001 | F(4,35)= 288,1 | p<0,0001 |

Tabela D: Valores de ANOVA calculados para os ensaios com biomarcadores bioquímicos e energéticos com *Danio rerio*

| Biomar-cador | ANOVA | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | DR60 | | DR73 | | DR78 | |
| AChE | F(4,35)= 0,9737 | p=0,4343 | F(4,35)= 8,102 | p<0,0001 | F(5,38)= 7,341 | p<0,0001 |
| GST | F(4,35)= 2,528 | p= 0,05 | F(4,35)= 0,8463 | p= 0,051 | F(5,40)= 5,880 | p= 0,0004 |
| CAT | F(4,33)= 1,528 | p= 0,2167 | F(4,34)= 6,213 | p= 0,0007 | F(5,39)= 15,08 | p<0,0001 |
| GT | F(4,35)= 12,60 | p<0,0001 | F(4,35)= 2,513 | p= 0,059 | F(4,35)= 6,852 | p<0,0001 |
| LPO | F(4,29)= 0,5599 | p= 0,6935 | F(4,32)= 0,1176 | p= 0,9753 | F(5,42)= 0,4212 | p= 0,8313 |
| LIP | F(4,35)= 0,5023 | p= 0,7342 | F(4,35)= 0,1808 | p= 0,9468 | F(5,42)= 11,01 | p<0,0001 |
| CARB | F(4,35)= 0,6788 | p= 0,6113 | F(4,35)= 0,5770 | p= 0,6812 | F(5,42)= 10,29 | p<0,0001 |
| PROT | F(4,33)= 1,412 | p= 0,2515 | F(4,35)= 0,3489 | p= 0,8430 | F(5,42)= 9,903 | p<0,0001 |
| Ed | F(4,33)= 1,335 | p= 0,2775 | F(4,34)= 1,297 | p= 0,2906 | F(5,42)= 14,14 | p<0,0001 |
| Ec | F(4,35)= 1,572 | p= 0,2034 | F(4,35)= 26,90 | p<0,0001 | F(5,42)= 78,83 | p<0,0001 |
| AEC | F(4,34)= 1,137 | p= 0,3557 | F(4,29)= 1,422 | p= 0,2516 | F(5,38)= 50,21 | p<0,0001 |

Ache: acetilcolinesterase
GST: glutationa S-transferase
Cat: catalase
GT: glutationa total
LPO: peroxidação lipídica
LIP: lipídios
CARB: carboidratos
PROT: proteínas
Ed: energia disponível
Ec: energia consumida
AEC: alocação de energia celular

# ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirõ Preto, constando a aprovação do projeto de pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**

*COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS*

# AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Perfil do impacto ecogenotoxicológico induzido após exposição de diferentes organismos à corantes têxteis dispersos", registrada sob nº 15.1.449.60.8, sob a responsabilidade de Gabriela Meireles e Danielle Palma de Oliveira, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião *de* 30/11/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

| | |
|---|---|
| Finalidade | ( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica |
| Vigência da Autorização | 01/09/15 a 15/04/2016 |
| Espécie/Linhagem/Raça | Peixe Danio rerio |
| Nº de animais | 1728 |
| Peso/Idade | Não se aplica/ Embriões |
| Sexo | Indiferente |
| Origem | Biotério Central do Campus USP RP |

Ribeirão Preto, 05 de dezembro de 2017.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892

ANEXO 2 - Primeira página do artigo publicado com os resultados dos ensaios de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

Science of the Total Environment 613–614 (2018) 1093–1103

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

# 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

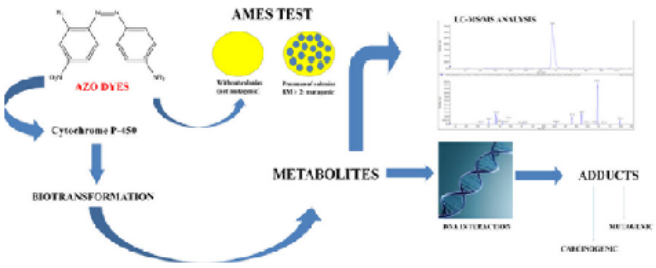
Jefferson Honorio Franco [a], Bianca F. da Silva [a], Regina V. Oliveira [b], Gabriela Meireles [c], Danielle Palma de Oliveira [c,*], Alexandre A. de Castro [d], Teodorico C. Ramalho [d], Maria V.B. Zanoni [a]

[a] Institute of Chemistry-State University "Julio de Mesquita Filho"-UNESP Avenida Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil
[b] Federal University of São Carlos, UFSCar, Department of Chemistry, Rod. Washington Luiz Km 235, Monjolinho, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil
[c] School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo - FCFRP/USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[d] Department of Chemistry, Federal University of Lavras, 37200-000 Lavras, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Biotransformation of azo dyes by rat liver microsomes
- Original textiles dyes and its degradation products may be harmful to the human health and environment.
- In vitro biotransformation experiments showed promising results for metabolism studies of azo molecules.
- Computational study and Ames test contributed to correlate dye's structure-mutagenicity relationship.
- LC-MS/MS technique has proved to be an important tool for characterization and identification of new compounds formed.

## GRAPHICAL ABSTRACT




## ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 29 May 2017
Received in revised form 7 August 2017
Accepted 27 August 2017
Available online 22 September 2017

Editor: Kevin V. Thomas

*Keywords:*
In vitro biotransformation
Rat liver microsome
Mass spectrometry
Textile dye
Ames Test
Computational study

## ABSTRACT

Azo dyes are known as a group of substances with DNA damage potential that depend on the nature and number of azo groups connected to aromatic rings (benzene and naphthalene), chemical properties, *e.g.* solubility and reactive functional groups, which significantly affect their toxicological and ecological risks. In this paper, we used *in vitro* models to evaluate the metabolism of selected textile dyes: Disperse Red 73 (DR 73), Disperse Red 78 (DR 78) and Disperse Red 167 (DR 167). To evaluate the mutagenic potential of the textile dyes, the Salmonella mutagenicity assay (Ames test) with strains TA 98 and TA 100 in the presence and absence of the exogenous metabolic system (S9) was used. DR73 was considered the most mutagenic compound, inducing both replacement base pairs (TA 100) and also changing frameshift (TA 98) mutations that are reduced in the presence of the S9 mixture. Furthermore, we used rat liver microsomes in the same experimental conditions of the S9 mixture to metabolize the dyes and the resultant solutions were analyzed using a liquid chromatography coupled to a quadrupole linear ion trap mass spectrometry (LC-MS/MS) to investigate the metabolites formed by the *in vitro* biotransformation. Based on this experiment, we detected and identified two biotransformation products for each textile dye substrate analyzed. Furthermore, to evaluate the interaction and reactivity of these compounds with DNA, theoretical calculations were also carried out. The results showed that the chemical reaction occurred preferentially at the azo group and the nitro group, indicating that there was a reduction in these groups by the

* Corresponding author.
*E-mail address:* dpalma@usp.br (D.P. de Oliveira).

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.271
0048-9697/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES