UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação ecogenotoxicológica de corante natural extraído de micro-
organismo**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Flavia Renata Abe

Orientadora: Prof. Dra. Danielle Palma de
Oliveira

Ribeirão Preto
2017

RESUMO

ABE, F. R. **Avaliação ecogenotoxicológica de corante natural extraído de micro-organismo**. 2017. 171f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Os corantes sintéticos são amplamente empregados em indústrias têxteis, de cosméticos, alimentícia, farmacêutica, dentre diversas outras. Entretanto, vários destes compostos apresentam elevada toxicidade intrínseca, e são precursores de intermediários tóxicos e/ou mutagênicos gerados durante a metabolização. Portanto, o emprego de corantes naturais destaca-se como uma alternativa aos sintéticos, na busca por compostos seguros para a saúde humana e ambiental. Neste contexto, no presente trabalho nós investigamos o potencial toxicológico e ecotoxicológico do corante natural eritrostominona (Ery), uma naftoquinona extraída de micro-organismo, utilizando modelos alternativos à experimentação animal. Adicionalmente, foi avaliada a ecotoxicidade do Basic Red 51 (BR51), um corante sintético azo utilizado em indústrias têxteis e de cosméticos, e do Ery degradado (EryD) após a exposição à luz, visando uma alternativa simples para o tratamento de efluentes industriais contendo o corante. As avaliações ecotoxicológicas foram realizadas em diferentes níveis tróficos: nos microcrustáceos *Daphnia magna* e nos estágios iniciais de desenvolvimento de zebrafish (*Danio rerio*). As avaliações toxicológicas do Ery foram realizadas em linhagem hepatocelular humana (HepG2) como órgão-alvo de metabolização de xenobióticos, e em epiderme humana equivalente (EHE), um modelo 3D construído com queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), visto que é esperado o contato dérmico devido ao potencial uso como corante de cosmético. Nossos resultados mostraram que o Ery e o BR51 são tóxicos para *D. magna* e zebrafish. O BR51 induziu alterações na imobilidade, na reprodução, no consumo de oxigênio e no comportamento de *D. magna* em concentrações até 200 vezes superiores às do Ery capazes de alterar a imobilidade, reprodução e comportamento. Todavia, para embriões e larvas de zebrafish ambos os corantes apresentaram efeitos tóxicos em concentrações próximas, com alterações do desenvolvimento embrionário e do comportamento, indução de efeitos pró-oxidantes e alterações no balanço energético dos organismos. O EryD interessantemente não apresentou nenhum efeito tóxico para os organismos aquáticos, demonstrando que a luz foi capaz de reduzir e/ou inativar a toxicidade da estrutura inicial. Para as linhagens celulares humanas, o Ery foi citotóxico para HepG2, tendo a apoptose como a principal causa de morte celular. O Ery também causou um atraso no ciclo celular de HepG2, em particular na fase da mitose (G2/M), diminuindo a proliferação das células. Por outro lado, o Ery não apresentou potencial genotóxico e mutagênico para HepG2 e não induziu citotoxicidade e genotoxicidade após exposições por períodos curtos em EHE. Em conclusão, o Ery e o BR51 são classificados como tóxicos e muito tóxicos para o ambiente aquático, respectivamente. O Ery também induz efeitos pró-apoptóticos, o qual pode estar ligado à estrutura química das quinonas. No entanto, o Ery apresenta potencial aplicabilidade industrial como um corante *eco-friendly*, com destaque para a simples e rápida fotodegradação, e como um corante não genotóxico e mutagênico para células humanas. Avaliações adicionais sobre os mecanismos de apoptose devem ser realizadas para assegurar a segurança à saúde humana.

Palavras-chaves: Eritrostominona, Basic Red 51, fotodegradação, zebrafish, daphnídeos, hepatócitos humanos, epiderme humana equivalente.

CONTEXTO DA TESE

CONTEXTO DA TESE

Múltiplos contaminantes emergentes estão presentes no ambiente e ocasionam situações de estresse na vida de diversos organismos. Aqui, destacamos os **corantes sintéticos** como contaminantes que representam um risco iminente à saúde humana e ao ambiente, devido às perturbações induzidas em organismos alvos e não-alvos por processos não completamente elucidados. O Basic Red 51, por exemplo, é um corante com comprovada atividade mutagênica para humanos e amplamente utilizado por indústrias têxteis e de cosméticos. Assim, a busca por **corantes naturais** menos tóxicos como alternativa ao uso dos corantes sintéticos tem aumentado em todo o mundo. Com um alto rendimento de produção, o corante natural eritrostominona destaca-se como potencial alternativa, mas sua toxicidade é desconhecida.

Diante do problema exposto, este trabalho foi delineado segundo a pergunta:

O corante natural eritrostominona é toxicologicamente viável para a aplicação industrial como alternativa aos corantes sintéticos?

Para responder a esta pergunta, avaliamos os efeitos tóxicos do eritrostominona (Ery) e do Basic Red 51 (BR51) e comparamos as respostas. Considerando que nas últimas décadas há uma forte demanda por métodos alternativos que substituam os tradicionais testes com animais, optamos por utilizar neste trabalho somente técnicas alternativas que visam detectar efeitos cada vez mais sensíveis e preditivos.

Visto que a preocupação com a saúde ambiental tem ganhado espaço em discussões científicas, neste trabalho, nossos objetivos foram analisar as respostas fisiológicas, bioquímicas e comportamentais de dois organismos aquáticos não-alvos pertencentes a diferentes níveis tróficos, o microcrustáceo *Daphnia magna* e o peixe zebrafish (*Danio rerio*), frente ao estresse induzido pela exposição aos corantes selecionados. Também analisamos a toxicidade do produto de fotodegradação do Ery (EryD) para o ambiente aquático, como uma alternativa ao tratamento dos efluentes industriais contendo o corante. Além disso, o eritrostominona também foi avaliado quanto à toxicidade para humanos, utilizando técnicas *in vitro* com o cultivo de hepatócitos humanos e epiderme humana equivalente.

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1 Corantes sintéticos e naturais

Capa: Pigmentos e corantes comercializados. Fonte: <http://www.dalcolortintas.com.br/dalcolor.php>.

Corantes sintéticos são amplamente utilizados por indústrias alimentícias, têxteis farmacêuticas ou de cosméticos, devido às propriedades favoráveis para a aplicação industrial, como a facilidade de obtenção, baixo custo, ampla faixa de coloração e estabilidades à luz, aquecimento e oxidação. Estima-se que sejam produzidos mundialmente de 700 a 800 mil toneladas de corantes sintéticos por ano, e os corantes contendo o grupo funcional azo ($N=N$) representam 60-70% da produção mundial (ZOLLINGER, 2003).

Com a produção em larga escala, as perdas para o ambiente também são consideráveis. Aproximadamente 2% dos corantes são perdidos durante o seu processo de produção, até 50% são perdidos na etapa de tintura de indústrias têxteis, e cerca de 70% são perdidos na água de lavagem de tinturas de cabelo. Consequentemente, o lançamento de corantes no ambiente aquático é estimado em 0,5 tonelada diariamente (ZANONI; YAMANAKA, 2016), em concentrações que atingem 10-50 mg/L (O'NEILL et al., 1999; CHUNG, 2000).

Este fato, somado à elevada estabilidade dos corantes azo no ambiente, tem gerado preocupações à saúde ambiental (SHARMA et al., 2011; FRAGA et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Sabemos que alguns corantes azo apresentam elevada toxicidade intrínseca ou são precursores de metabólitos tóxicos e/ou mutagênicos (REID et al., 1984; CHUNG, 2000; UMBUZEIRO et al., 2005; FERRAZ et al., 2011; CHEQUER et al., 2011; ZANONI et al., 2013; LEME et al., 2015), contudo a toxicidade para organismos aquáticos ainda é insuficientemente explorada. Alguns estudos reportaram que a qualidade da água de rios contendo corantes azo é afetada, como observado em amostras de água apresentando atividade mutagênica (COELHO et al., 1992; VALENT et al., 1993; UMBUZEIRO et al., 2005). Efeitos deletérios de corantes azo já foram reportados para alguns organismos de água doce, tais como

para o microcrustáceo *Daphnia similis* (LUNA et al., 2014), o cnidária *Hydra attenuata* (JONG et al., 2016) e o peixe *Labeo rohita* (KAUR; KAUR, 2015).

Diante dos efeitos tóxicos, a Comissão Europeia reduziu o número de corantes aprovados para fins de consumo humano ou limitou a concentração utilizada nos produtos (SCCNFP 2001; EC Directive 2002/61/EC; EC 2015/1190/EC). O corante azo Basic Red 51 (BR51) (Figura 1A), por exemplo, é amplamente utilizado por indústrias de cosméticos em tinturas de cabelo, shampoos, condicionadores, dentre outros produtos (BASF, 2017), com produção anual de até 0,5 tonelada (IARC, 2010). Recentemente, seu uso foi revisado pela regulamentação europeia por apresentar evidências claras de atividade mutagênica em ensaios com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) em condições de metabolização redutiva (EU SCCS/1436/11). Apesar disso, existem poucos estudos sobre a sua toxicidade, e os dados disponíveis mostram a indução de danos apenas em células humanas de pele e fígado (ZANONI et al., 2014; TAFURT-CADORNA et al., 2015; ALÉPÉE et al., 2016).

Figura 1. Estrutura química do corante sintético Basic Red 51 (A) e do corante natural eritrostominona (B).

Dentro deste contexto, os corantes derivados de fontes naturais têm sido empregados para conferir cor a produtos manufaturados como uma alternativa promissora para a substituição dos corantes sintéticos (CHIGURUPATI et al., 2002; PRABHAKARA RAO et al., 2005; MONGKHOLRATTANASIT et al., 2010; CARO et al., 2012; BOONSONG et al., 2012; BOGA et al., 2013; SHAHID et al., 2013; PUNRATTANASIN et al., 2013; LOPES et al., 2013). Além disso, os corantes naturais possuem a vantagem de fácil biodegradação antes de serem descartados em efluentes domésticos e industriais (VELMURUGAN et al., 2010; ZHOU et al., 2012). A bioatividade destes corantes também pode, em alguns casos, agregar valores aos produtos por apresentarem, por exemplo, atividades anti-inflamatórias, antimicrobicas, antioxidantes e anticânceres (KITTA KOOP et al., 1999; XIAO; ZHONG, 2007; KUWAHARA et al., 2009; ZHOU et al., 2012; ANANTHARAMAN et al., 2014; SILVA et al., 2014).

As principais fontes de corantes naturais são os vegetais (caules, folhas, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos e bactérias). Entre os colorantes de maior interesse atualmente, encontram-se os compostos pertencentes aos carotenoides, antocianinas, clorofilas, melaninas, betalaínas e quinonas extraídos de vegetais, sendo alguns já aprovados para consumo e comercialização (CARO et al., 2012; DUFOSSÉ et al., 2014). Entretanto, o potencial dos vegetais como fontes de corantes em escala industrial é limitado pelos custos de produção e disponibilidade de matéria, a qual necessita ser cultivada em grandes quantidades e depende de fatores climáticos e de amplo espaço. Com isso, a produção biotecnológica de corantes por processos fermentativos de micro-organismos vem se destacando, com as vantagens de maior rendimento, uso de substratos de baixo custo, pequeno espaço físico necessário para a produção e independência das condições climáticas (CARO et al., 2012).

O grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP) (Ribeirão Preto, Brasil), tem trabalhado com sucesso na área de biotecnologia, produzindo corantes naturais a partir de micro-organismos. Atualmente, o grupo investiga corantes pertencentes às quinonas, com a finalidade de extrair e caracterizar àqueles com potencial aplicação industrial. Dentre os diversos corantes já investigados, destaca-se o corante vermelho eritrostominona (Ery) (Figura 1B), uma naftoquinona extraída de um fungo endofítico (em fase de identificação) isolado de folhas de *Rhizophora mangle*, com alto rendimento de produção. Este resultado abre uma grande perspectiva para a avaliação do Ery como potencial corante para aplicação comercial. Sabe-se que o Ery já foi anteriormente isolado de outras espécies de fungos (CROSS et al., 1972; KITTA KOOP et al., 1999; UNAGUL et al., 2005; PRATHUMPAI et al., 2007), e possui bioatividade antimalárica e antioxidante (KITTA KOOP et al., 1999); entretanto, dados toxicológicos e ecotoxicológicos são escassos ou inexistentes.

1.2 Avaliação ecotoxicológica para organismos aquáticos

Capa: Rio Jian (Henan, China) contaminado por indústria têxtil. Fonte: <https://pensamentoambiental.wordpress.com>.

A introdução de contaminantes no ambiente por atividades antropogênicas representa um sério risco para a saúde ambiental. Portanto, testes com organismos aquáticos são parte integrante da identificação de perigo ambiental e avaliação de risco de substâncias químicas e efluentes. Os testes incluem informações sobre a toxicidade em vários níveis tróficos e requerem testes com invertebrados e vertebrados, em particular com microcrustáceos e peixes, respectivamente. Todavia, o uso de vertebrados em experimentação levanta preocupações éticas e é considerado inadequado para avaliar todas as substâncias e efluentes que exigem testes regulatórios (MARTINS et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008; SCHOLZ et al., 2013).

Nas últimas décadas, tem havido uma forte demanda por estratégias e métodos alternativos que substituam os tradicionais testes com animais (BRAUNBECK et al., 2005; LAMMER et al., 2009; EMBRY et al., 2010; SCHOLZ et al., 2013; BUSQUET et al., 2014). Baseados na estratégia dos 3R (*Reduction, Replacement, Refinement*) (RUSSELL; BURCH, 1959), diversos bioensaios alternativos já estão disponíveis para prever os riscos ambientais de substâncias químicas, como testes de toxicidade com cultivos de células *in vitro* e embriões de peixe.

Neste trabalho, foram adotados métodos experimentais alternativos regulamentados pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), visando assegurar uma harmonização internacional. Os testes ecotoxicológicos foram realizados com os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Daphnia similis*, e com peixe zebrafish (*Danio rerio*) na sua fase inicial de vida, selecionados como indicadores de contaminação aquática de diferentes níveis tróficos. A seguir, serão apresentados brevemente os organismos testes, e os respectivos ensaios selecionados para a realização deste trabalho.

1.2.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

Capa: Exemplares de zebrafish (*Danio rerio*). Fonte: <http://www.tecam.com.br/segmentos/ambiental/>.

O zebrafish (*D. rerio*) (Actinopterygii: Cyprinidae, Hamilton-Buchanan 1822) é um pequeno peixe (3-5 cm) tropical bentopelágico nativo da Índia e região sul da Ásia (EATON; FARLEY, 1974). Assim como outras espécies de peixe, o zebrafish apresenta os estágios de desenvolvimento embrionário, larval, juvenil e adulto. A eclosão do embrião ocorre em 72-96 horas pós-fertilização (hpf), e o estágio larval inicia-se após 120 hpf com o início da alimentação exógena, atingindo a maturidade em apenas 3 meses (EMBRY et al., 2010).

Algumas características particulares tornam o zebrafish um organismo modelo para a (eco)toxicologia, como rápido desenvolvimento, baixo custo, fácil manutenção em laboratório, elevada fecundidade e transparência dos ovos e embriões. Em condições apropriadas, uma fêmea desova cerca de 50-200 ovos por dia (NAGEL, 2002; SCHOLZ et al., 2008; EMBRY et al., 2010; STRAHLE et al., 2012; SCHOLZ et al., 2013). O genoma completamente sequenciado do zebrafish e a similaridade genética aos camundongos e humanos também se destacam quanto às possíveis extrapolações para modelos vertebrados (BARBAZUK et al., 2000; NAVRATILOVA; BECKER, 2009; KETTLEBOROUGH et al., 2013).

Dentro deste contexto, o uso de embriões de zebrafish nos ensaios tem se destacado como um modelo promissor. De acordo com a comissão de regulamentações da União Europeia, o uso de estágios embrionários de vertebrados não está sujeito às regulamentações de bem-estar animal (EC Diretiva 86/609/EEC), portanto, os experimentos com os embriões são considerados métodos alternativos ao uso de animais (SCHOLZ et al., 2008). Ao contrário dos métodos com linhagens celulares de peixe, o modelo do embrião oferece um sistema complexo e multicelular que abrange a interação entre vários tecidos, o que permite desde abordagens mais tradicionais, como mortalidade, até técnicas em níveis moleculares e bioquímicos (SCHOLZ et al., 2008).

1.2.1.1 Teste de embriotoxicidade (FET)

Capa: Desenvolvimento embrionário de zebrafish (*Danio rerio*). Fonte: próprio autor. Aumento 40 ×.

O teste de embriotoxicidade em peixes (*Fish Embryo Toxicity* - FET) (OECD *Guideline* 236, 2013) foi proposto por Nagel (2002) como uma alternativa aos testes de toxicidade aguda em peixes adultos (OECD *Guideline* 203, 1992). Existe uma elevada correlação entre os resultados de testes com adultos e embriões (BRAUNBECK et al., 2005; LAMMER et al., 2009; KNOBEL et al., 2012), e o FET se mostrou mais sensível comparado aos testes com células de peixe *in vitro*, detectando desde substâncias extremamente tóxicas até àquelas capazes de induzir mínimos efeitos tóxicos aos peixes adultos (BRAUNBECK; LAMMER, 2006).

O monitoramento dos embriões de zebrafish se inicia com a exposição dos ovos fertilizados às substâncias químicas e continua até completar 96 hpf, momento em que os embriões já eclodiram, com registros diários das malformações letais, subletais e teratogênicas. A transparência dos ovos e embriões de zebrafish facilita a observação dos indicadores morfológicos analisados durante o FET, como o desprendimento da cauda, a formação dos somitos, o desenvolvimento dos olhos e da pigmentação, a formação de edemas, além de uma variedade de deformidades morfológicas indicadoras de efeitos teratogênicos, como a malformação da cabeça, dos otólitos, da cauda e do coração, escolioses, raquitismo, deformações do saco vitelínico e crescimento retardado (NAGEL, 2002).

Junto aos indicadores morfológicos, outros indicadores subletais, como batimento cardíaco, taxa de eclosão e movimentos espontâneos, tem contribuído para o entendimento dos processos de desenvolvimento, nos estudos de mecanismos e de efeitos a longo prazo de diversas substâncias químicas (NAGEL, 2002; SCHOLZ et al., 2008).

1.2.1.2 Comportamento

Capa: Larvas de zebrafish monitoradas no equipamento ZebraBox. Fonte: próprio autor.

O uso do comportamento como ferramenta da toxicologia tem sido sugerido para investigar problemas neurológicos e de locomoção causados pela exposição à contaminantes ambientais. Com o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de realizar análises automatizadas, a determinação de medidas de comportamento de organismos aquáticos tornou-se possível. Estudos tem mostrado a elevada sensibilidade do comportamento de embriões e larvas de zebrafish quando comparado aos testes de toxicidade tradicionais (MACPHAIL et al., 2009; PADILLA et al., 2011; ANDRADE et al., 2016). A locomoção de larvas de zebrafish expostas ao fungicida carbendazim, por exemplo, mostrou elevada sensibilidade ao detectar problemas em concentrações 8.750 vezes abaixo do que aquelas capazes de alterar o desenvolvimento embrionário (ANDRADE et al., 2016).

Do ponto de vista ecológico, o comprometimento da atividade locomotora de organismos aquáticos pode comprometer as interações entre presa e predador no ambiente e, consequentemente, a sobrevivência (FINGER et al., 1985; LOVERN et al., 2007). Burgess e Granato (2007) sugerem que as respostas locomotoras de larvas de zebrafish também estão relacionadas ao comportamento de alimentação e busca por refúgios. Além disso, alterações na locomoção de zebrafish possuem elevada correlação com danos neurológicos mediados por enzimas colinérgicas (MACPHAIL et al., 2009; SELDERSLAGHS et al., 2010; PADILLA et al., 2011; CHEN et al., 2011) e custos metabólicos envolvidos em processos de detoxificação (ANDRADE et al., 2015).

1.2.1.3 Biomarcadores bioquímicos

Capa: fonte: <http://www.bmglabtech.com/en/applications/application-notes/>.

Os biomarcadores bioquímicos são respostas biológicas quantificadas no interior dos organismos e indicam um desvio do estado normal causado pela exposição a xenobióticos (TIMBRELL, 1998). Os efeitos em níveis hierárquicos superiores, como em populações, são sempre precedidos por mudanças nos processos biológicos, que podem ser sinalizadas pelos biomarcadores. As alterações detectadas indicam que os xenobióticos foram absorvidos e distribuídos entre os tecidos e provocaram um efeito tóxico no organismo (VAN DER OOST et al., 2003), e a elevada sensibilidade das respostas permite identificar o potencial de perigo dos xenobióticos, entender o modo de ação e prevenir os riscos (DOMINGUES et al., 2010).

Vários biomarcadores bioquímicos são empregados em avaliações toxicológicas, com destaque para as alterações no sistema colinérgico (DOMINGUES et al., 2010; ANDRADES et al., 2015), no sistema de detoxificação (VAN DER OOST et al., 2003; GRAVATO; GUILHERMINO, 2009; ZHANG et al., 2012, GRAVATO et al., 2014, KAUR; KAUR, 2015) e no balanço energético (MCKEE; KNOWLES, 1986; DE COEN; JANSSEN, 1997; SMOLDERS et al., 2003; SMOLDERS et al., 2004; PATRICIO-SILVA; AMORIM, 2016).

Alguns estudos evidenciaram que as alterações em biomarcadores bioquímicos ocorrem em concentrações abaixo daquelas capazes de alterar o desenvolvimento embrionário de zebrafish (DOMINGUES et al., 2010; VAN BOXTEL et al., 2010; ZHANG et al., 2012; PÉREZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; ANDRADE et al., 2015). Portanto, técnicas complementares ao FET, tais como os biomarcadores bioquímicos, aumentam a predição dos resultados ao detectar efeitos mais sensíveis, e fornecem informações adicionais sobre o modo de ação dos tóxicos. A seguir, apresentaremos brevemente os biomarcadores bioquímicos selecionados para a realização deste trabalho.

1.2.1.3.1 Biomarcador colinérgico

As atividades neurológicas dos organismos são extremamente sensíveis a contaminantes ambientais, o que faz do sistema nervoso uma importante fonte de respostas biomarcadoras. A acetilcolinesterase (AChE), por exemplo, é uma importante enzima relacionada às funções neurais e musculares e amplamente distribuída no reino animal. Sua atividade está envolvida na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e acetato (Figura 2) e na prevenção de uma super-estimulação nervosa (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003; HOWCROFT et al., 2011). Esta atividade configura a base de muitas das funções biológicas essenciais, como reportado para funções neuromusculares, respiração, comportamento e alimentação de peixes (VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003; FISCHER et al., 2015).

Usualmente, a atividade da AChE é inibida em organismos não-alvos por uma série de contaminantes, como metais (GUILHERMINO et al., 1996; JEMEC et al., 2010), inseticidas carbamatos e organofostorados (GUILHERMINO et al., 1996; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (GRAVATO et al., 2014) e detergentes (GUILHERMINO et al., 1998). Um dos efeitos causados por estes xenobióticos consiste em mudanças na sinalização colinérgica que causam um desequilíbrio nos níveis de acetilcolina extracelular. A inibição da AChE resulta na hiperestimulação dos receptores de acetilcolina pós-sinápticos, o que leva a aberrações fisiológicas que vão desde a disfunção comportamental à morte (HAVERROTH et al., 2015). Entretanto, os trabalhos avaliando os efeitos colinérgicos de corantes são escassos ou inesistentes.

Figura 2. Esquema da quebra da acetilcolina em acetato e colina pela atividade da enzima acetilcolinesterase.

Fonte: adaptado de <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>.

1.2.1.3.2 Biomarcadores de detoxificação e estresse oxidativo

Os sistemas de detoxificação de organismos aeróbicos são extremamente sensíveis a diversos contaminantes ambientais (VAN DER OOST et al., 2003; VALAVANIDIS et al., 2006). O metabolismo de xenobióticos geralmente converte compostos lipofílicos em produtos mais facilmente excretados através de uma variedade de enzimas e proteínas. Na fase I do metabolismo, reações de oxidação, redução e hidrólise resultam em metabólitos mais polares que as substâncias originais, com destaque para as enzimas monoxigenases e citocromo P450 (CYP450). Na fase II, moléculas reativas ou metabólitos da fase I são conjugados com moléculas endógenas polares, tornando-as mais hidrofílicas para a excreção. A glutathione S-transferase (GST) é a principal enzima desta fase, relacionada com a conjugação das moléculas com a glutathione (GSH), um tripeptídeo de elevada polaridade (VAN DER OOST et al., 2003).

Todavia, durante o processo de detoxificação são formadas moléculas altamente reativas, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs incluem radicais livres e outras formas capazes de reagir com macromoléculas celulares e gerar danos oxidativos, como a inativação de enzimas, a peroxidação lipídica, danos no DNA e morte celular. O equilíbrio entre a produção regulada das EROs e mecanismos antioxidantes capazes de neutralizá-las é fundamental para a saúde dos organismos. A neutralização ocorre por uma série de enzimas antioxidantes intracelulares (Figura 3), dentre elas, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), responsável pela inativação do superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), responsáveis pela degradação do H_2O_2 em água. O tripeptídeo GSH também é responsável por auxiliar nas defesas antioxidantes, interrompendo a cadeia de reações induzidas pelos radicais livres (VAN DER OOST et al., 2003; VALAVANIDIS et al., 2006).

Como a exposição a contaminantes ambientais não é constante ao longo do tempo, os organismos são capazes de se adaptarem às flutuações de estresse oxidativo pela síntese adicional de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos quando expostos a compostos pró-oxidantes (VALAVANIDIS et al., 2006). Diversos autores têm reportado um aumento nos níveis e atividades antioxidantes em organismos não-alvos expostos a contaminantes ambientais, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (GRAVATO; GUILHERMINO, 2009; GRAVATO et al., 2014), efluentes têxteis (ZHANG et al., 2012) e alguns corantes azo (KAUR; KAUR, 2015; JONG et al., 2016).

Figura 3. Esquema de estresse oxidativo induzido por xenobiótico. CYP450: citocromo P450, GST: glutathione S-transferase, GSH: glutathione reduzida, GSSG: glutathione oxidada, SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, OH: radical hidroxila.

Fonte: adaptado de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cell-biology-products.html?TablePage=9553473>.

Entretanto, apesar da elevada atividade antioxidante, ainda assim vários contaminantes induzem um desequilíbrio oxidativo (ALMEIDA et al., 2012; GOMES et al., 2012; GRAVATO et al., 2014; NEWMAN et al., 2015). A peroxidação lipídica, por exemplo, é induzida por uma série de reações em cadeia devido à elevada reatividade dos fosfolípidos com as EROs (Figura 4), o que leva à perda de permeabilidade e integridade das membranas celulares. Os produtos da peroxidação lipídica também são capazes de formar adutos de DNA, e consequentemente mutações e alterações no padrão de expressões gênicas (VALAVANIDIS et al., 2006).

Figura 4. Exemplo de reações em cadeia da peroxidação lipídica induzida por radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs). LH: cadeia de lipídios poli-insaturados; R[•]: radical livre reativo; OH[•]: espécie reativa de oxigênio; L[•]: radical lipídico centrado no carbono; LOO[•]: radical peroxila; LOOH: hidroperóxido de lipídio.

Iniciação da peroxidação lipídica:

Propagação da peroxidação lipídica:

Fonte: adaptado de Valavanidis et al. (2006).

1.2.1.3.3 Biomarcador de balanço energético

Diversos autores têm reportado a relevância ecológica do uso de biomarcadores relacionados ao balanço energético em organismos modelos, pois fornecem informações sobre as reservas energéticas e seu consumo, fundamentais para a manutenção, crescimento e reprodução dos organismos (Figura 5) (MCKEE; KNOWLES, 1986; DE COEN; JANSSEN, 1997; SMOLDERS et al., 2003; SMOLDERS et al., 2004).

Figura 5. Ilustração do balanço energético em peixes. A energia ingerida é perdida por excreção, ação dinâmica específica (ADE) e egestão (não assimilação ou indigestão), ou alocada para custos basais, crescimento, locomoção, armazenamento, atividade física e reprodução.

Fonte: adaptado de Treberg et al. (2016).

As reservas energéticas são armazenadas como carboidratos, lipídios e proteínas, e a diminuição de seus níveis armazenados tem sido atribuída ao aumento de demandas energéticas em condições de estresse (MCKEE; KNOWLES, 1986; PATRÍCIO-SILVA; AMORIM, 2016). Carboidratos e lipídios representam as principais fontes de energia e são rapidamente mobilizados para suprimir demandas energéticas (DE COEN; JANSSEN, 1997; SMOLDERS et al., 2003), enquanto proteínas são mobilizadas apenas em condições severas (MCKEE; KNOWLES, 1986).

Considerando que os contaminantes ambientais frequentemente induzem respostas energeticamente custosas, como o aumento dos níveis e atividades do sistema de detoxificação, a alocação de energia para outros processos fisiológicos pode ser comprometida (DE COEN; JANSSEN, 1997; SMOLDERS et al., 2003; GRAVATO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; PATRÍCIO-SILVA; AMORIM, 2016). Desta forma, o estudo da alocação de energia celular (AEC) permite avaliar os efeitos de compostos químicos no balanço energético de organismos testes, por meio da diferença entre as reservas energéticas e a energia consumida (DE COEN; JANSSEN, 1997).

1.2.1.4 Genotoxicidade

Capa: Cometa formado durante o ensaio *Comet Assay*. Fonte: próprio autor.

A integridade do DNA é essencial para a manutenção da dinâmica populacional em espécies aquáticas. O uso de eventos genotóxicos como biomarcadores sinalizam potenciais efeitos de contaminantes ambientais a longo prazo, em particular no sucesso reprodutivo e na incidência de malformações em seus descendentes (DEVAUX et al., 2011; LACAZE et al., 2011). Em função da importante implicação ecológica associada à genotoxicidade, a detecção e quantificação de danos genéticos em organismos não-alvos são de grande interesse em estudos ambientais (VAN DER OOST et al., 2003; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003).

Diversos compostos químicos aumentam a frequência de quebras de fita de DNA, como metais, compostos nitroaromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e dioxinas (VALAVANIDIS et al., 2006; DOMINGUES et al., 2010). Os efeitos genotóxicos podem ser associados aos estresses oxidativos induzidos por radicais livres e EROs, como o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), que reage com as bases nucleotídicas e cadeias de pentoses (Figura 6) e resulta em danos no DNA e formação de proteínas defeituosas. A reação do radical $\text{OH}^\bullet$ com o carbono 8 da base nitrogenada guanina, por exemplo, forma a 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), e durante o processo de duplicação do DNA, a 8-OHdG pareia-se de forma errônea com uma molécula de adenina (par de bases G–A no lugar de G–C), fenômeno chamado de transversão de bases. Caso não haja o reparo do erro, poderá haver transcrição de um RNA mensageiro alterado, com a consequente tradução de uma proteína defeituosa. Outros radicais hidroxilas podem reagir diretamente com a cadeia de pentose-fosfato do DNA e induzir danos como sítios apurínicos com a remoção da base nitrogenada, quebras de fita e oxidação da pentose (VALAVANIDIS et al., 2006). Desta forma, os biomarcadores de estresse oxidativo em combinação com ensaios de genotoxicidade podem elevar a sensibilidade dos resultados.

Figura 6. Esquema com algumas regiões do DNA susceptíveis à ataques por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (setas vermelhas). O esquema contém as bases nitrogenadas guanina (purina) e timina (pirimidina) ligadas à cadeia de pentose-fosfato.

Fonte: adaptado de: Dumont e Monari (2015).

O ensaio de eletroforese de célula única (*Single cell electrophoresis test*) ou ensaio do cometa (*comet assay*) em condições alcalinas tem sido utilizado como um método sensível para quantificar danos no DNA em zebrafish (KOSMEHL et al., 2006; ADEYEMI et al., 2015). Ele detecta principalmente lesões primárias no DNA, sobretudo quebras simples e duplas, sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas (Figura 7) (TICE et al., 2000; COLLINS et al., 2008). Após a exposição dos organismos à substância química, as membranas e organelas das células são lisadas, e o material genético é submetido a eletroforese em solução tampão alcalina, que induz a ruptura dos pares de bases do DNA devido ao elevado pH e permite a detecção de quebras de fita simples e duplas. Quanto mais quebras no DNA, menor o tamanho dos fragmentos e maior a extensão de migração, caracterizada em forma de um cometa com a cauda correspondente aos fragmentos que migraram (ÖSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988; MCKELVEY-MARTIN et al., 1993; TICE et al., 2000).

Figura 7. Esquema de lesões de quebras de fita simples, quebra de fita dupla e ligações cruzadas no DNA.

Fonte: adaptado de <http://www.ilocis.org/documents/chpt33e.htm>.

1.2.2 *Daphnia magna* e *Daphnia similis*

Capa: Exemplar de *Daphnia similis*. Fonte: <http://www.aplysia.com.br/pt/servicos/areas/ecotoxicologia/>.

A espécie *D. magna* (Branchiopoda: Cladocera) é um microcrustáceo planctônico de água doce encontrado em regiões temperadas, altamente sensível às mudanças no ambiente aquático. Estes organismos são padronizados para testes ecotoxicológicos e representam os invertebrados aquáticos devido à importante posição na cadeia trófica como consumidores primários e por servirem de alimentos para diversos organismos (BAE; FREEMAN, 2006; MARTINS et al., 2007). Algumas características os tornam adequados para os estudos ecotoxicológicos, como o tamanho relativamente pequeno (5-6 mm), a fácil manutenção em laboratório, ciclo de vida curto, alta fecundidade e reprodução por partenogênese. A elevada correlação entre resultados com daphnídeos e mamíferos tornou estes organismos modelos alternativos aos testes de *screening* em mamíferos para reduzir o número de animais em experimentação (GUILHERMINO et al., 2000; MARTINS et al., 2007; DEVILLERS et al., 2009).

Considerando que a *D. magna* não ocorre naturalmente em regiões tropicais, o uso de outras espécies possibilita extrapolar os resultados a cenários mais realísticos. A *Daphnia similis*, por exemplo, é encontrada em regiões tropicais e se adapta às águas de baixa condutividade, uma característica das águas da região do estado de São Paulo. Ambas espécies possuem sensibilidades correlacionadas para diversos contaminantes aquáticos, dentre eles metais, herbicidas e detergentes (RODGHER et al., 2010; BURATINI et al., 2014).

Diversos estudos ecotoxicológicos realizados em daphnídeos aplicam avaliações de imobilidade, reprodução, comportamento e análises fisiológicas (MARTINS et al., 2007; REN et al., 2009; PESTANA et al., 2010; NOSS et al., 2013; OKAMOTO et al., 2014; BARATA et al., 2016). A seguir, apresentaremos brevemente os ensaios selecionados para a realização deste trabalho.

1.2.2.1 Análises do ciclo de vida completo

Capa: Exemplar de *Daphnia similis*. Fonte: <http://www.aplysia.com.br/pt/servicos/areas/ecotoxicologia/>.

Os tradicionais testes de toxicidade aguda em daphnídeos (OECD *Guideline* 202, 2004) são utilizados para avaliar uma grande variedade de compostos, como metais (OKAMOTO et al., 2014; KIM et al., 2017), praguicidas, solventes, detergentes (MARTINS et al., 2007) e corantes (BAE et al., 2006; BAE; FREEMAN, 2007; LIU et al., 2007; KANHERE et al., 2014; DARSANA et al., 2015). O critério para a determinação da toxicidade aguda é a completa imobilização destes organismos após 24-48 horas de exposição à substância química em estudo (OECD *Guideline* 202, 2004).

Todavia, considerando a ocorrência de baixas concentrações de contaminantes no ambiente aquático, os testes subletais de reprodução (OECD *Guideline* 211, 2012) ou análises do ciclo de vida (*Life-history Toxicity Tests*) (ASTM E1193 - 97, 2012) tem ganhado destaque nas avaliações de segurança química. A reprodução dos daphnídeos por partenogênese (assexuada) ocorre naturalmente durante a maior parte do ciclo de vida, com a produção de ovos diploides. As ninhadas da *D. magna* são tipicamente formadas por fêmeas, e sob condições favoráveis, cada fêmea adulta pode conter mais de 100 ovos. Os neonatos permanecem na câmara de incubação das fêmeas por aproximadamente três dias, e são então liberados na água e atingem a idade reprodutiva (EBERT, 2005).

Sob condições adversas, as fêmeas podem responder com a produção de ovos de resistência, alterações no tempo de maturação reprodutiva e no número e tamanho de descendentes (COORS et al., 2004; PESTANA et al., 2010; FURUHAGEN et al., 2014; STANLEY et al., 2016; TRAUDT et al., 2016; BARATA et al., 2016). Do ponto de vista ecológico, alterações na reprodução podem acarretar em uma redução na taxa intrínseca de crescimento populacional dos organismos, a qual compromete a manutenção da população e eleva os riscos de extinções das populações locais (PESTANA et al., 2010).

1.2.2.2 Biomarcadores de custo metabólico e comportamento

Capa: Rastreamento da natação de *Daphnia magna*. Fonte: próprio autor.

As respostas fisiológicas e comportamentais de daphnídeos a estressores ambientais são eficientes indicadores para avaliar os efeitos tóxicos de xenobióticos. Condições ambientais desfavoráveis podem causar um declínio nos custos metabólicos de daphnídeos, analisados pela quantificação da taxa respiratória dos organismos (MICHELS et al., 2000; MARTINS et al., 2007; REN et al., 2009; BAHRNDORFF et al., 2015; HANSEN; ROSLEV, 2016; HÄDER; ERZINGER, 2017). Estas alterações no consumo de oxigênio são associadas a alterações na alocação energética que causam prejuízo a outras funções fisiológicas, como crescimento, reprodução e desenvolvimento (CHOPELET et al., 2008; PESTANA et al., 2010; PESTANA et al., 2013; BARATA et al., 2016).

Também são verificados desvios no característico padrão de natação, na fototaxia e na busca por alimentos (MICHELS et al., 2000; MARTINS et al., 2007; REN et al., 2009; BAHRNDORFF et al., 2015; HANSEN; ROSLEV, 2016; HÄDER; ERZINGER, 2017). A fototaxia extremamente positiva da *D. magna* é modulada por fatores como escassez de alimento, presença de pistas químicas de predadores e xenobióticos (MICHELS et al., 2000; BURKS et al., 2002; PESTANA et al., 2010), e esta resposta facilita a detecção de estresses induzidos por xenobióticos. As alterações comportamentais também estão associadas aos custos metabólicos e problemas na alocação de energia, que elevam o risco de predação (LOVERN et al., 2007; PESTANA et al., 2010).

Visto que o comportamento é mediado por respostas fisiológicas dos organismos em condições de estresse, e o metabolismo está associado a diversos prejuízos fisiológicos, o uso destes biomarcadores biológicos, juntamente com as análises do ciclo de vida, contribuem para uma melhor elucidação do modo de ação dos compostos químicos e seus efeitos a longo prazo (LOVERN et al., 2007), aumentando a sensibilidade dos resultados.

1.3 Avaliação da toxicidade para culturas celulares humanas

Capa: Cultura celular. Fonte: <http://isic.net.br/artigo-40>.

A exposição aos corantes também está relacionada a diversos efeitos nocivos à saúde humana (CHUNG, 2000; PAPAGEORGIOU et al., 2007; AUFFAN et al., 2009; FERRAZ et al., 2012; ZANONI et al., 2014; LEME et al., 2015; CHEQUER et al., 2015). Considerando o potencial tóxico e/ou mutagênico de diversos corantes e outros xenobióticos, a avaliação de risco é requerida por agências regulatórias nacionais e internacionais, realizada em uma variedade de marcadores biológicos em níveis celulares. Dentro da avaliação de risco, as etapas de identificação e caracterização do perigo são indispensáveis para investigar a toxicidade intrínseca e relação dose-resposta dos agentes químicos (USEPA, 2015).

Culturas celulares humanas são utilizadas com sucesso em estudos *in vitro* de avaliação toxicológica dos agentes químicos. A escolha do tipo celular está relacionada ao objetivo do estudo, de acordo com a via de exposição (oral, cutânea ou pulmonar). As avaliações de danos induzidos à saúde humana podem, por exemplo, ser realizadas em diferentes tipos celulares, como em culturas celulares humanas primárias ou imortalizadas, e o uso de linhagens imortalizadas reduz as variações intra- e inter-laboratoriais e aumenta a reprodutibilidade, ao contrário das linhagens primárias (BROHEM et al., 2010). Os modelos também podem ser diferentes, como modelos em monocamada ou tridimensionais, construídos a partir de um sistema de (co)cultivo celular tridimensional (RIMOLDI et al., 1991).

A seguir, serão apresentadas brevemente as linhagens celulares e ensaios selecionados para a avaliação preliminar da toxicidade humana.

1.3.1 Hepatócitos humanos

Capa: Corte histológico de fígado humano. Fonte: Reytan, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_liver.jpg.

O fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos devido à habilidade dos hepatócitos de expressar quantitativamente enzimas de detoxificação de fase I e II, responsáveis por uma série de reações que facilitam a excreção dos xenobióticos ou os tornam metabolicamente reativos (Figura 8). Assim, o uso de hepatócitos humanos, como a linhagem imortalizada de hepatoblastoma primário (HepG2), é recomendado em estudos toxicológicos que envolvem a metabolização e ativação de xenobióticos (NATARAJAN; DARROUDI, 1991; KNASMÜLLER et al., 1998; MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004).

A HepG2 mantém muitas funções especializadas que são perdidas em células primárias, como a secreção de enzimas de fase I (CYP450 1A1, 1A2, 2B, 2C, 3A e 2E1, aril-hidrocarbono hidroxilases, nitroredutases, N-dimetilases, catalases, peroxidases, NAD(P)H:citocromo *c* redutases, CYP450 redutases e NAD(P)H:quinona oxidoreduases) e fase II (sulfotransferases, UDP glucuronil transferases, N-acetil transferases, glutathione S-transferases e epóxido hidrolases) (KNASMÜLLER et al., 1998; MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004). Entretanto, as HepG2 vêm apresentando deficiências na atividade CYP450 quando comparadas aos hepatócitos humanos primários, apresentando atividades basais de biotransformação (GUILLOUZO et al., 2007; DONATO et al., 2008, GERETS et al., 2012). Portanto, estas células são úteis para testes de *screening*, e os resultados devem ser interpretados com cautela.

Figura 8. Esquema da metabolização e biotransformação de xenobióticos em hepatócitos humanos.

1.3.2 Equivalentes de epiderme humana

Capa: Epiderme humana reconstruída. Fonte: <http://www.episkin.com/en/Training>.

A pele humana é o maior órgão do corpo humano e está exposta a múltiplos xenobióticos presentes no ambiente, como poluições (ANDREASSI; ANDREASSI, 2004) e substâncias químicas presentes em produtos comercializados (CHUONG et al., 2002). A elevada superfície de contato da pele e o impacto que ela sofre do ambiente externo torna-a um excelente modelo de estudo. Ensaios *in vitro* utilizando a engenharia de pele humana têm sido alvo de indústrias de cosméticos, visto que estes modelos permitem avaliar agentes químicos em um ambiente biomimético, e não somente em células isoladas. A construção e validação de peles equivalentes vem sendo otimizadas e seus resultados correlacionados com dados *in vivo*, tornando-as um excelente modelo *in vitro* preditivo (BROHEM et al., 2010; MATHES et al., 2014).

A epiderme equivalente, por exemplo, é produzida com o cultivo tridimensional de queratinócitos humanos, os quais são expostos a um sistema de interface ar-líquido para estimular a diferenciação e estratificação das camadas epidérmicas. O uso da linhagem celular imortalizada de queratinócitos humanos (HaCaT) na construção de modelos epidérmicos destaca-se pela elevada reprodutibilidade e capacidade de diferenciação preservada, sendo utilizada em engenharia de pele equivalente como alternativa às células primárias (SCHOOP et al., 1999; BOELSMA et al., 1999; BROHEM et al., 2010; ZANONI et al., 2014).

Figura 9. Estrutura estratificada da epiderme. Criosecção de epiderme humana reconstruída (8 μ m, coloração H.E.). Esquema das correspondentes camadas da epiderme.

Fonte: adaptado de: EpiCS®, <http://reconstructed-human-epidermis.com/overview/background/>.

1.3.3 Citotoxicidade celular

A citotoxicidade celular expressa os efeitos adversos nas propriedades estruturais e/ou funcionais de um ou mais componentes celulares comuns a todos os tecidos (citotoxicidade basal) e/ou em células tecido-específicas (citotoxicidade tecido-específica) (GARLE et al., 1994). Diversos tipos de citotoxicidade já foram descritos, dentre eles apoptose, morte celular associada com autofagia, necrose ou oncoses, e alterações mitóticas (KRYSKO et al., 2008). Os ensaios de citotoxicidade em modelos celulares *in vitro* predizem o potencial letal agudo de compostos tóxicos a nível celular (GARLE et al., 1994).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* para avaliar a viabilidade celular são realizados por diversos princípios. O teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), por exemplo, baseia-se na medida do dano induzido pelas substâncias tóxicas no metabolismo celular, avaliando as atividades enzimáticas das desidrogenases mitocondriais. A viabilidade celular é quantificada por espectrofotometria pela redução do sal tetrazolato ou MTT, de coloração amarela e hidrossolúvel, em sal de formazan, de coloração roxa e lipossolúvel (Figura 10) (DENIZOT; LANG, 1986; PERES et al., 2008). A redução do MTT reflete a presença de células viáveis, ou seja, ocorre quando há desidrogenases mitocondriais ativas, portanto diretamente proporcional à viabilidade celular (PERES et al., 2008).

Figura 10. Esquema da redução do MTT a sal de formazan pelas enzimas desidrogenases mitocondriais.

Fonte: adaptado de Rogan Grant, https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMTT_reaction.png.

Ensaio de morte celular via apoptose e/ou necrose também são amplamente utilizados para verificar a citotoxicidade de agentes químicos. A morte celular por apoptose é um mecanismo de morte celular programada das células para manter a homeostase, processo

dependente de enzimas endógenas, sendo caracterizada pela perda de volume celular, prolongamentos da membrana plasmática, condensação da cromatina e formação dos corpos apoptóticos fagocitados pelas células adjacentes. O processo de apoptose pode ser induzido via extrínseca, por estressores extracelulares propagados por receptores transmembranas, ou via intrínseca, por sinalizações intracelulares, como o estresse oxidativo e danos no DNA (GALLUZZI et al., 2012). Por outro lado, a necrose trata-se de um rompimento da membrana plasmática pelo inchaço das células, ocasionando a liberação do conteúdo citoplasmático, o qual desencadeia um processo inflamatório (KRYSKO et al., 2008).

O ensaio de anexina V / PI, por exemplo, quantifica a morte celular pela detecção de apoptose e necrose por citometria de fluxo. A anexina V é uma proteína com alta afinidade por fosfolipídios da membrana celular, capaz de detectar a externalização do sinalizador de apoptose fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática (Figura 11). Já o iodeto de propídeo (PI) é um fluorocromo intercalante de DNA de elevado peso molecular, não permeável à membrana plasmática íntegra, portanto uma vez que a célula entra em processo de necrose, o PI entra na célula e se liga ao DNA, corando-o intensamente (KRYSKO et al., 2008; ZHIVOTOVSKY et al., 1999).

Figura 11. Esquema da coloração de células em apoptose pela anexina V.

Fonte: adaptado de http://www.bdbiosciences.com/br/instruments/accuri/articles/archive/2015_02/index.jsp.

1.3.4 Genotoxicidade e mutagenicidade

Testes de genotoxicidade e mutagenicidade são importantes para avaliações da segurança de substâncias químicas que serão ou já se encontram disponíveis no mercado. Diferentes indicadores devem ser considerados, como mutações de ponto e danos cromossômicos, os quais podem ser relacionados tanto a alterações numéricas (poliploidia e aneuploidia) como estruturais (quebras, perdas, rearranjos etc). Desta forma, avaliações genotóxicas/mutagênicas requerem uma elaborada estratégia de análise, na qual testes celulares *in vitro* possuem um importante papel neste processo (SPEIT, 2009; MUN et al., 2009).

O ensaio de eletroforese de célula única (*Single cell electrophoresis test*) ou ensaio do cometa (*comet assay*) em condições alcalinas é um método sensível para avaliações genotoxicológicas, utilizado tanto para testes ecotoxicológicos (apresentado no item 1.2.1.4), como para a detecção de agentes químicos potencialmente genotóxico para a saúde humana, detectando principalmente as lesões primárias no DNA, como quebras simples e duplas, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas e eventos de reparo incompletos (Figura 7) (TICE et al., 2000; COLLINS et al., 2008). Entretanto, esta técnica é utilizada para mensurar lesões no DNA passíveis de correção (ÖSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988; MCKELVEY-MARTIN et al., 1993; TICE et al., 2000).

Por outro lado, o potencial mutagênico de compostos químicos pode ser avaliado pelo ensaio *in vitro* denominado ensaio do micronúcleo (MN), um biomarcador de instabilidade cromossômica (TERREDAS et al., 2010; VRAL et al., 2011; FENECH et al., 2011). Neste ensaio, as células expostas às substâncias mutagênicas formam, além do núcleo principal, pequenos núcleos no citoplasma, chamados de MNs, ou pontes nucleoplasmáticas interligando dois núcleos principais. Os MNs são formados por um atraso do cromossomo acêntrico inteiro na fase de anáfase da divisão celular, ou por fragmentos de cromátides acêntricas não incorporados ao núcleo principal, gerados por erros no reparo de quebras da dupla fita de DNA ou pelo não reparo destas quebras. Durante a telófase, uma membrana nuclear envolve estes fragmentos ou cromossomos atrasados, havendo perda de cromatina no núcleo principal. Já as pontes nucleoplasmáticas originam-se de cromossomos dicêntricos com as extremidades dos seus telômeros fundidas ou por erros no reparo de quebras na dupla fita do DNA (Figura 12) (VALENTIN-SEVERIN et al. 2003; IARMARCOVAI et al., 2008; FENECH et al., 2011).

Figura 12. Esquema de formação de micronúcleo (MN) por atraso do cromossomo acêntrico inteiro e por fragmentos de cromátides acêntricos não incorporados ao núcleo principal, e ponte nucleoplasmática em células binucleadas submetidas a divisão celular na presença do bloqueador de citocinese citocalasina B.

Fonte: adaptado de Fenech (2007).

Os surgimentos de MNs e pontes nucleoplasmáticas devem ser visualizados apenas em células que completaram um ciclo de divisão celular (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003), para que sejam contabilizadas somente as mutações que foram transmitidas às células filhas, uma vez que o dano genético se estabiliza na geração posterior. Consequentemente, a frequência de MN só é assegurada após garantir que todas as células passaram pelo processo de mitose. Assim, o adjuvante citocalasina B, um inibidor da polimerização da proteína actina, é adicionado ao ensaio. A actina é indispensável para a formação do anel de microfilamentos, responsável pela contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células-filhas (citocinese), e a presença do inibidor bloqueia a citocinese, mas não a divisão celular e, consequentemente, ocorre um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram apenas por um ciclo de divisão (VRAL et al., 2011).

1.4 Justificativa

Diversos corantes sintéticos apresentam potenciais tóxico e/ou mutagênico, entretanto muitos deles continuam disponíveis para utilização por setores industriais. Com base nos ensaios toxicológicos, comissões internacionais restringiram o número de corantes aprovados para fins de consumo humano (EC 2015/1190/EC, 2015; EC Directive 2002/61/EC, 2002; SCCNFP, 2001), despertando interesses no desenvolvimento de corantes naturais seguros para a saúde humana e ambiental. Dentro deste contexto, o nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de Química da FFCLRP, USP (Ribeirão Preto, Brasil) iniciou a avaliação ecogenotóxicológica do corante vermelho natural **eritrostominona** (Ery), uma naftoquinona extraída de micro-organismos com potencial aplicação industrial. Optamos por também avaliar o **eritrostominona fotodegradado** (EryD) para os organismos aquáticos, visando uma possível forma de tratamento simples e rápida dos efluentes contendo o corante. O corante azo sintético **Basic Red 51** (BR51) também foi avaliado para os organismos aquáticos, uma vez que a toxicidade deste corante para a saúde humana já foi realizada pelo nosso grupo (ZANONI et al., 2014) e os dados relacionados à saúde ambiental são escassos. Assim, sabendo da toxicidade deste corante sintético, este foi utilizado como parâmetro de comparação em termos de toxicidade em relação ao corante natural.

1.5 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial ecogenotóxicológico do Ery e do EryD em comparação com o BR51 para os organismos aquáticos, e o potencial ecogenotóxicológico do Ery para linhagens celulares humanas.

Os objetivos específicos são:

1. Avaliar o potencial genotóxico e a toxicidade do Ery, EryD e BR51 para o desenvolvimento embrionário, alterações bioquímicas, no balanço energético e no comportamento de zebrafish (*Danio rerio*).
2. Avaliar a toxicidade do Ery, EryD e BR51 para a imobilidade, alterações na reprodução, no comportamento e no custo metabólico de *Daphnia magna*.
3. Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do Ery para células HepG2.
4. Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do Ery para epiderme humana equivalente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados reportados neste trabalho mostram que o corante natural Ery possui potencial aplicabilidade industrial em relação a sua toxicidade para a saúde humana e ambiental. A avaliação toxicológica deste composto demonstrou que o corante não possui potencial genotóxico e mutagênico nas condições testadas, requisitos importantes para a utilização industrial. No entanto, o Ery demonstrou ser pró-apoptótico em HepG2, apesar de seu potencial antioxidante. Tal fato merece ser estudado para elucidar os mecanismos da apoptose, visto que diversas quinonas naturais possuem atividades pró-apoptóticas em células de carcinoma.

Em relação a ecotoxicidade, os corantes Ery e BR51 mostraram-se tóxicos e pró-oxidantes para as fases embriolarvais de zebrafish. Ambos os corantes alteraram o desenvolvimento embrionário, com danos no consumo energético, no comportamento e no sistema de detoxificação, evidenciado pela condição de estresse oxidativo dos embriões. Por outro lado, os microcrustáceos *D. magna* apresentaram elevada sensibilidade ao BR51, o qual foi extremamente tóxico aos organismos.

Após a fotodegradação do Ery, o composto formado (EryD) não apresentou nenhum efeito tóxico aos organismos aquáticos, demonstrando a perda da toxicidade da estrutura original e ausência de fotoproducto ou metabólico tóxico. Este fato sugere um possível tratamento dos efluentes industriais contendo o Ery, de maneira fácil, rápida e barata.

De forma específica considerando os objetivos propostos, concluímos que:

1. O Ery e o BR51 alteram a sobrevivência, o desenvolvimento embrionário e a atividade locomotora de zebrafish em estágios embriolarvais. Eles também elevam as respostas do sistema de detoxificação e desequilibram o balanço energético dos organismos. Após fotodegradação do Ery, o produto formado não apresenta toxicidade nas condições testadas.
2. O Ery e BR51 alteram a sobrevivência, reprodução e atividade locomotora de *D. magna*. Após a fotodegradação do Ery, o produto formado não apresenta toxicidade.
3. O Ery protege mitocôndrias de ratos de danos oxidativos, e não possui potencial genotóxico para a linhagem celular HepG2 e para a epiderme humana equivalente. Entretanto, ele induz efeitos pró-apoptóticos em HepG2.

Download more graphics at www.psdgraphics.com

REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, J. A.; MARTINS-JUNIOR, A. C.; BARBOSA JR, F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 172-173, p. 7-12, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.001>.
- ALÉPÉE, N.; HIBATALLAH, J.; KLARIC, M.; MEWES, K. R.; PFANNENBECKER, U.; MCNAMEE, P. Assessment of cosmetic ingredients in the in vitro reconstructed human epidermis test method EpiSkin™ using HPLC/UPLC-spectrophotometry in the MTT-reduction assay. *Toxicology in Vitro*, v. 33, p. 105-117, 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.006>.
- ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chemosphere*, v. 86, p. 926-937, 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.059>.
- ANANTHARAMAN, A.; SUBRAMANIAN, B.; CHANDRASEKARAN, R.; SEENIVASAN, R.; SIVA, R. Colorants and cancer: a review. *Industrial Crops and Products*, v. 53, p. 167-186, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.025>.
- ANDRADE, T. S.; HENRIQUES, J. F.; ALMEIDA, A. R.; MACHADO, A. L.; KOBAYASHI, O.; GIANG, P. T.; SOARES, A. M. V. M.; DOMINGUES, I. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 390-399, 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>.
- ANDREASSI, M.; ANDREASSI, L. Antioxidants in dermocosmetology: from the laboratory to clinical application. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 2, p. 153-160, 2004, <https://doi.org/10.1111/j.1473-2130.2004.00075.x>.
- ASTM E1193-97 (2012), Standard Guide for Conducting Daphnia magna Life-Cycle Toxicity Tests, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012, www.astm.org.
- AUFFAN, M.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; DE MEO, M.; THILL, A.; ZEYONS, O. CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Journal Nanotoxicology*, v. 3, p. 161-171, 2009, <http://dx.doi.org/10.1080/17435390902788086>.
- BAE, J. S.; FREEMAN, H. S.; Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments*, v. 73, p. 81-85, 2007, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.10.015>.
- BAE, J. S.; FREEMAN, H. S.; KIM, S. D. Influence of new azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fibers and Polymers*, v. 7, p. 30-35, 2006, <https://doi.org/10.1007/BF02933599>.
- BAHRNDORFF, S.; MICHAELSEN, T. Y.; JENSEN, A.; MARCUSSEN, L. F.; NIELSEN, M. E.; ROSLEV, P. Automated swimming activity monitor for examining temporal patterns of toxicant effects on individual *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, v. 36, p. 896-902, 2015, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3212>.
- BARATA, C.; CAMPOS, B.; RIVETTI, C.; LEBLANC, G. A.; EYTCHESON, S.; MCKNIGHT, S.; TOBOR-KAPLON, M.; DE VRIES BUITENWEG, S.; CHOI, S.; CHOI, J.; SARAPULTSEVA, E. I.; COUTELLE, M.-A.; COKE, M.; PANDARD, P.; CHAUMOT, A.; QUÉAU, H.; DELORME, N.; GEFFARD, O.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; WATANABE, H.; TATARAZAKO, N.; LOPES, I.; PESTANA, J. L. T.; SOARES, A. M. V. M.; PEREIRA, C. M.; DE SCHAMPHELAERE, K. Validation of a two-generational reproduction test in *Daphnia magna*: An interlaboratory exercise. *Science of the Total Environment*, v. 579, p. 1073-1083, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.066>.
- BARBAZUK, W. B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J. A.; MCPHERSON, J. D.; JOHNSON, S. L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research*, v. 10, p. 1351-1358, 2000, <http://dx.doi.org/10.1101/gr.144700>.
- BASF. Safety data sheet. Vibracolor® Ruby Red. ID 30481011/SDS_COS_EU/EN. Disponível em: https://worldaccount.basf.com/wa/SA~pt_BR/Catalog/Cosmetics/doc4/BASF/PRD/30481011/.pdf?asset_type=msds/pdf&language=PT&validArea=BR&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8804ca389.pdf. Acesso em: 04 Fev. 2017.
- BOELSMA, E.; VERHOEVEN, M. C. H.; PONEC, M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *Journal of Investigative Dermatology*, v. 112, p. 489-498, 1999, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00545.x>.

- BOGA, C.; DELPIVO, C.; BALLARIN, B.; MORIGI, M.; GALLI, S.; MICHELETTI, G.; TOZZI, S. Investigation on the dyeing power of some organic natural compounds for a green approach to hair dyeing. *Dyes and Pigments*, v. 97, p. 9-18, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.11.020>.
- BOONSONG, P.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O. Natural pigments from six species of Thai plants extracted by water for hair dyeing product application. *Journal of Cleaner Production*, v. 37, p. 93-106, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.06.013>.
- BRAUNBECK, T.; BÖTTCHER, M.; HOLLERT, H.; KOSMEHL, T.; LAMMER, E.; LEIST, E.; RUDOLF, M.; SEITZ, N. 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.
- BRAUNBECK, T.; LAMMER, E. Fish embryo toxicity assays. *German Federal Environment Agency*, 298 pp, 2006.
- BROHEM, C. A.; CARDEAL, L. B. S.; TIAGO, M.; SOENGAS, M. S.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Research*, v. 24, p. 35-50, 2010, <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x>.
- BURATINI, S. V.; BERTOLLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 73, p. 878-882, 2014, <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0508-8>.
- BURGESS, H. A.; GRANATO, M. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *The Journal of Experimental Biology*, v. 210, p. 2526-2539, 2007, <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.003939>.
- BUSQUET, F.; STRECKER, R.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T.; CARR, G. J.; CENIJN, P.; FOCHTMAN, P.; GOURMELON, A.; HUBLER, N.; KLEENSANG, A.; KNOBEL, M.; KUSSATZ, C.; LEGLER, J.; LILLICRAP, A.; MARTINEZ-JERONIMO, F.; POLLEICHTNER, C.; RZODECZKO, H.; SALINASM, E.; SCHNEIDERM, K. E.; SCHOLZ, S.; VAN DEN BRANDHOF, E-J.; VAN DER VEM, L. T. M.; WALTER-ROHDE, S.; WEIGT, S.; WITTERS, H.; HALDER, M. Validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 69, n. 3, p. 496-511, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vrtph.2014.05.018>.
- CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAND, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSE, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. *Natural Products and Bioprospecting*, v. 2, p. 174–193, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13659-012-0086-0>.
- CHEN, T. H.; WANG, Y. H.; WU, Y. H. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquatic Toxicology*, v. 102, p. 162-166, 2011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.010>.
- CHEQUER, F. M. D.; LIZIER, T. M.; FELÍCIO, R.; ZANONI, M. V. B.; DEBONSI, H. M.; LOPES, N. P., MARCOS, R.; OLIVEIRA, D. P.; Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye Disperse Red 1. *Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 2054-2063, 2011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.033>.
- CHEQUER, F. M. D.; VENÂNCIO, V. P.; PRADO, M. R. S.; CUNHA-JUNIOR, L. R. C. S.; LIZIER, T. M.; ZANONI, M. V. B.; BURBANO, R. R.; BIANCHIA, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. The cosmetic dye quinoline yellow causes DNA damage in vitro. *Mutation Research*, v. 777, p. 54-61, 2015, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.003>.
- CHIGURUPATI, N.; SAIKI, L.; GAYSER JR, C.; DASH, A. K. Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 241, p. 293-299, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00246](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00246).
- CHOPELET, J.; BLIER, P. U.; DUFRESNE, F. Plasticity of growth rate and metabolism in *Daphnia magna* populations from different thermal habitats. *Journal of Experimental Zoology, Part A, Ecological Genetics and Physiology*, p. 553-562, 2008, <https://doi.org/10.1002/jez.488>.
- CHUNG, K. T.; Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 18:1, p. 51-74, 2000, <http://dx.doi.org/10.1080/10590500009373515>.
- CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M.; GOLDSMITH, L. A.; MACHER, E.; MADERSON, P. A.; SUNDBERG, J. P.; TAGAMI, H.; PLONKA, P. M.; THESTRUP-PEDERSEN, K.; BERNARD, B. A.;

- SCHRÖDER, J. M.; DOTTO, P.; CHANG, C. H.; WILLIAMS, M. L.; FEINGOLD, K. R.; KING, L. E.; KLIGMAN, A. M.; REES, J. L.; CHRISTOPHERS, E. What is the “true” function of skin? *Experimental Dermatology*, v. 11, p. 159-187, 2002.
- COELHO, M. C. L. S.; COIMBRÃO, C. A.; VALENT, G. U.; SATO, M. I. Z.; SANCHEZ, P. S.; TARGA, H. Mutagenicity evaluation of industrial effluents by Ames assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 19, S20, p. 199-211, 1992.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gem051>.
- COORS, A.; HAMMERS-WIRTZ, M.; RATTE, H. T. Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to xenobiotics. *Chemosphere*, v. 56, p. 395-404, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.025>.
- CROSS, B.E.; EDINBERRY, M.N.; TURNER, W.B; Pigments of *Gnomonia erythrostoma*. Part I. The structures of erythrostominone, deoxyerythrostominone, and deoxyerythrostominol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. p. 380-390, 1972.
- DARSANA, R.; CHANDRASEHAR, G.; DEEPA, V.; GOWTHAMI, Y.; CHITRIKHA, T.; AYYAPPAN, S.; GOPARAJU, A. Acute toxicity assessment of Reactive Red 120 to certain aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 95, n. 5, p. 582-587, 2015, <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1636-z>.
- 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, <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. *Journal of Immunological Methods*, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DEVAUX, A.; FIAT, L.; GILLET, C.; BONY, S. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology*, v. 101, n. 2, p. 405-411, 2011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.017>.
- DEVILLERS, J. *Ecotoxicology Modeling. Emerging Topics in Ecotoxicology: princípios, approaches and perspectives*, v. 2, 2009, <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0197-2>.
- DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C. K.; MENDO, S.; SOARES, A. M. V. M. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 152, n. 3, p. 338-345, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.010>.
- DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Current Drug Metabolism*, v. 9, p. 1-11, 2008, <https://doi.org/10.2174/138920008783331086>.
- DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A. S.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 26, p. 56-61, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.007>.
- DUMONT, E.; MONARI, A. Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: the role of molecular modeling. *Frontiers in Chemistry*, v. 3, p. 43, 2015, <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2015.00043>.
- EATON, R. C.; FARLEY, R. D. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia*, v. 1, p. 195-209, 1974.
- EBERT, D. Ecology, epidemiology, and evolution of parasitismo in *Daphnia*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>. Acesso em: 03 Agos. 2017.
- EC, 1986. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Community L* 358/1, 1-28.

- EC. Commission Regulation (EU) 2015/1190/EC of 20 July 2015 amending Annex III to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. *Official Journal of the European Union L* 193/115.
- EC. Directive 2002/61/EC of the European Parliament and of the council of 19 July 2002 amending for the nineteenth time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azocolourants). *Official Journal of the European Union L* 243/15.
- EMBRY, M. R.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. A.; GALAY-BURGOS, M.; HALDER, M.; HINTON, D. E.; LÉONARD, M. A.; LILLICRAP, A.; NORBERG-KINGI, T.; WHALE, G. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, v. 97, p. 79-87, 2010, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nature Protocols*, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLS, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, Y. H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, v. 26, p. 125-132, 2011, <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>.
- FERRAZ, E. R. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F. M. D.; ZANONI, M. V. B.; DORTA, D. J.; OLIVEIRA, D. P. 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, n.5, p. 489-497, 2011, <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20576>.
- FERRAZ, E. R. A.; ZHAOHUI, L.; BOUBRIAK, O.; OLIVEIRA, D. P. Hepatotoxicity assessment of the azo dyes Disperse Orange 1 (DO1), Disperse Red 1 (DR1,) and Disperse Red 13 (DR13) in HepG2 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, v. 75, p. 991-999, 2012, <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2012.696513>.
- FINGER, S. E.; LITTLE, E. E.; HENRY, M. G.; FAIRCHILD, J. F.; BOYLE, T. P. Comparison of laboratory and field assessment of fluorine - part I: effects of fluorine on the survival, growth, reproduction, and behavior of aquatic organisms in laboratory tests. *American Society for Testing and Materials Special Technical Testing Publication* 865, ASTM, Philadelphia, PA. p.120-133, 1985.
- FISCHER, A.; WOLMAN, M.; GRANATO, M.; PARSONS, M.; MCCALLION, A. S.; PROESCHER, J.; ENGLISH, E. Carbamate nerve agent prophylactics exhibit distinct toxicological effects in zebrafish embryos model. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 50, p. 1-10, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2015.05.001>.
- FRAGA, L. E.; FRANCO, J. H.; ORLANDI, M. O.; ZANONI, M. V. B.; Photoelectrocatalytic oxidation of hair dye basic red 51 at W/WO3/TiO2 bicomposite photoanode activated by ultraviolet and visible radiation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 1, p. 194-199, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.04.018>.
- FURUHAGEN, S.; FUCHS, A.; BELLEZA, E. L.; BREITHOLTZ, M.; GOROKHOVA, E. Are pharmaceuticals with evolutionary conserved molecular drug targets more potent to cause toxic effects in non-target organisms? *Plos One*, v. 9, e105028, 2014, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105028>.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differentiation*, v. 19, p. 107-120, 2012, <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
- GARLE, M. J.; FENTEM, J. H.; FRY, J. R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicology in Vitro*, v. 8, p. 1303-1312, 1994.
- GERETS, H. H.; TILMANT, K.; GERIN, B.; CHANTEUX, H.; DEPELCHIN, B.O.; DHALLUIN, S.; ATIENZAR, F. A.; Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology Toxicology*, v. 28, p. 69-87, 2012, <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>.
- GOMES, S. I. L.; NOVAIS, S. C.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; SCOTT-FORDSMAND, J. J.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. Effect of Cu-nanoparticles versus one Cu-salt: analysis of stress

- biomarkers response in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta). *Nanotoxicology*, v. 6, p. 134–143, 2012, <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2011.562327>.
- GRAVATO, C.; ALMEIDA, J. R.; SILVA, C.; OLIVEIRA, C.; SOARES, A. M. V. M. Using a multibiomarker approach and behavioural responses to assess the effects of anthracene in *Palaemon serratus*. *Aquatic Toxicology*, v. 149, p. 94-102, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.024>.
- GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of benzo(a)pyrene on seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): biomarkers, growth and behavior. *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 15, p. 121-137, 2009, <http://dx.doi.org/10.1080/10807030802615659>.
- GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M. C.; SOARES, A. M. V. M. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, v. 3, p. 157-163, 1998.
- GUILHERMINO, L.; DIAMANTINO, T.; SILVA, M.C.; SOARES, A. M. V. M. 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, <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.2000.1916>.
- 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.
- GUILLOUZO, A.; CORLU, A.; ANINAT, C.; GLAISE, D.; MOREL, F.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, v. 168, p. 66-73, 2007, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.003>.
- HÄDER, D. P.; ERZINGER, G. S. Daphniatox - Online monitoring of aquatic pollution and toxic substances. *Chemosphere*, v. 167, p. 228-235, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.155>.
- HANSEN, L. R.; ROSLEV, P. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology*, v. 179, p. 36-43, 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.010>.
- HAVERROTH, G. M. B.; WELANG, C.; MOCELIN, R. N.; POSTAY, D.; BERTONCELLO, K. T.; FRANCESCON, F.; ROSEMBERG, D. B.; MAGRO, J. D.; CORTE, C. L. D. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 122, p. 440-447, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.012>.
- HOWCROFT, C. F.; GRAVATO, C.; AMORIM, M. J. B.; NOVAIS, S. C.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. Biochemical characterization of cholinesterases in *Enchytraeus albidus* and assessment of in vivo and in vitro effects of diferente soil properties, copper and phenmedipham. *Ecotoxicology*, v. 20, p. 119-130, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-010-0562-4>.
- IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures*. International Agency for Research on Cancer, IARC, Lion, France, 99, 2010.
- IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research*, v. 658, p. 215-233, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.001>.
- JEMEC, A.; DROBNE, D.; TISLER, T.; SEPCIC, K. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, p. 571-581, 2010, <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>.
- JONG, L.; PECH, N.; UMBUZEIRO, G. A.; MOREAU, X.; Multi-scale biomarker evaluation of the toxicity of a commercial azo dye (Disperse Red 1) in an animal model, the freshwater cnidarian *Hydra attenuata*. *Water research*, v. 96, p. 62-73, 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.043>.
- KANHERE, J.; GOPINATHAN, R.; BANERJEE, J. Cytotoxicity and Genotoxicity of Malachite Green on Non-Target Aquatic Organisms: *Chlorella Pyrenoidosa* and *Daphnia Magna*. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 225, n. 2134, 2014, <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2134-3>.
- KAUR, S.; KAUR, A. Variability in antioxidant/detoxification enzymes of *Labeo rohita* exposed to an azo dye, Acid Black (AB). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 167, p. 108-116, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.009>.

- KETTLEBOROUGH, R. N. W.; BUSCH-NENTWICH, E. M.; HARVEY, S. A.; DOOLEY, C. M.; BRUIJN, E.; EEDEN, F.; SEALY, I.; WHITE, R. J.; HERD, C.; NIJMAN, I. J.; FE'NYES, F.; MEHROKE, S.; SCAHILL, C.; GIBBONS, R.; WALL, N.; CARRUTHERS, S.; HALL, A.; YEN, J.; CUPPEN, E.; STEMPLE, D. L. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, v. 496, p. 494–497, 2013, <http://dx.doi.org/10.1038/nature11992>.
- KIM, H.; YIM, B.; BAE, C.; LEE, Y. M. Acute toxicity and antioxidant responses in the water flea *Daphnia magna* to xenobiotics (cadmium, lead, mercury, bisphenol A, and 4-nonylphenol). *Toxicology and Environmental Health Sciences*, v. 9, n. 1, p. 41–49, 2017, <http://dx.doi.org/10.1007/s13530-017-0302-8>.
- KITTAKOOP, P.; PUNYA, J.; KONGSAEREE, P.; LERTWERAWAT, Y.; JINTASIRIKUL, A.; TANTICHARON, M.; THEBTARANONTH, Y. Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 453–457, 1999, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00272-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00272-1).
- KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, v. 102, p. 85–202, 1998, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00297-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00297-2).
- KNOBEL, M.; BUSSE, F. J. M.; RICO-RICO, A.; KRAMER, N. I.; HERMENS, J. L. M.; HAFNER, C.; TANNEBERGER, K.; SCHIRMER, K.; SCHOLZ, S. Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environmental Science & Technology*, v. 46, p. 9690–9700, 2012, <http://dx.doi.org/10.1021/es301729q>.
- KOSMEHL, T.; HALLARE, A. V.; REIFFERSCHIED, G.; MANZ, W.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, T. A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 8, p. 2097–2106, 2006, <http://dx.doi.org/10.1897/05-460R.1>.
- KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, v. 44, p. 205–221, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>.
- KUWAHARA, R.; HATATE, H.; YUKI, T.; MURATA, H.; TANAKA, R.; HAMA, Y. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocardia crassispina*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 1296–1300, 2009, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.020>.
- LABOUTA, H. I.; THUDE, S.; SCHNEIDER, M. Setup for investigating gold nanoparticle penetration through reconstructed skin and comparison to published human skin data. *Journal of Biomedical Optics*, v. 18, p. 01–08, 2013, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.6.061218>.
- LACAZE, E.; GEFFARD, O.; GOYET, D.; BONY, S.; DEVAUX, A. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research*, v. 111, p. 626–634, 2011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2011.03.012>.
- LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. H. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 149, p. 196–209, 2009, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>.
- LEME, D. M.; PRIMO, F. L.; GOBO, G. G.; COSTA, C. R. V.; TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. P. Genotoxicity assessment of reactive and disperse textile dyes using human dermal equivalent (3D cell culture system). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 78, p. 466–480, 2015, <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2014.999296>.
- LEME, D. M.; PRIMO, F. L.; GOBO, G. G.; COSTA, C. R. V.; TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. P. Genotoxicity assessment of reactive and disperse textile dyes using human dermal equivalent (3D cell culture system). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 78, p. 466–480, 2015, <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.999296>.
- LIU, H.; YU, H.; GIESY, J. P.; SUN, Y.; WANG, X. Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, v. 66, n. 11, p. 2159–2165, 2007, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.005>.
- LOPES, F. C.; TICHOTA, D. M.; PEREIRA, J. M.; SEGALIN, J.; RIOS, A. O.; BRANDELLI, A. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 171, p. 616–625, 2013, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-013-0392-y>.

- LOVERN, S. B.; STRICKLER, J. R.; KLAPER, R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C₆₀, and C₆₀HxC₇₀Hx). *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 12, p. 4465–4470, 2007, <http://dx.doi.org/10.1021/es062146p>.
- LUNA, L. A. V.; SILVA, T. H. G.; NOGUEIRA, R. F. P.; KUMMROW, F.; UMBUZEIRO, G. A. Aquatic toxicity of dyes before and after photo-Fenton treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 276, p. 332–338, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.047>.
- MACPHAIL, R. C.; BROOKS, J.; HUNTER, D. L.; PADNOS, B.; IRONS, T. D.; PADILLA, S. Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*, v. 30, p. 52–58, 2009, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011>.
- MARTINS, J.; SOARES, M. L.; SAKER, M. L.; OLIVATELES, L.; VASCONCELOS, V. M. Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 67, p. 417–422, 2007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.003>.
- MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 69–70, p. 81–102, 2014, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006>.
- MCKEE, M. J.; KNOWLES, C. O. Protein, nucleic acid and adenylate levels in *Daphnia magna* during chronic exposure to chlordecone. *Environmental Pollution*, v. 42, p. 335–351, 1986.
- MCKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B. L.; DE MÉO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, v. 288, p. 47–63, 1993, [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90207-V](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90207-V).
- MCKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B. L.; DE MEO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, v. 288, p. 47–63, 1993, [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90207-V](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90207-V).
- MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, v. 198, p. 329–340, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.009>.
- MICHELS, E.; SEMSARI, S.; BIN, C.; DE MEESTER, L. Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 47, p. 261–265, 2000, <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1962>.
- MONGKHOLRATTANASIT, R.; KRYŠT FEK, J.; WIENER, J. Dyeing and fastness properties of natural dyes extracted from eucalyptus leaves using padding techniques. *Fibers and Polymers*, v. 11, p. 346–350, 2010, <https://doi.org/10.1007/s12221-010-03468>.
- MUN, G. C.; AARDEMA, M. J.; HU, T.; BARNETT, B.; KALUZHNY, Y.; KLAUSNER, M.; KARETSKY, V.; DAHL, E.; CURREN, R. D. Further development of the EpiDerm™ 3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 673, p. 92–99, 2009, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.12.004>.
- NAGEL, R. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, v. 19 (Suppl.1), p. 38–48, 2002.
- NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagen/carcinogens. *Mutagenesis*, v. 6, p. 399–403, 1991, <https://doi.org/10.1093/mutage/6.5.399>.
- NAVRATILOVA, P.; BECKER, T. S. Genomic regulatory blocks in vertebrates and implications in human disease. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, v. 8, n. 4, p. 333–342, 2009, <http://dx.doi.org/10.1093/bfpg/elp019>.
- NEWMAN, T. A. C.; CARLETON, C. R.; LEEKE, B.; HAMPTON, M. B.; HORSFIELD, J. A. Embryonic oxidative stress results in reproductive impairment for adult zebrafish. *Redox Biology*, v. 6, p. 648–655, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.10.010>.
- NOSS, C.; DABRUNZ, A.; ROSENFELDT, R. R.; LORKE, A.; SCHULZ, R. Three-dimensional analysis of the swimming behavior of *Daphnia magna* exposed to nanosized titanium dioxide. *Plos One*, v. 8, n. 11, e.80960, 2013, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080960>.
- O'NEILL, C.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; LOURENÇO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; DELÉE, W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 74, p. 1009–1018, 1999, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660).

- OECD, 1992. *OECD Guideline for Testing Chemicals. Test n.º 203: fish, acute toxicity test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD Publishing.
- OECD, 2004. *OECD Guideline for Testing Chemicals. Test n.º 202: Daphnia sp., acute immobilisation test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD Publishing.
- OECD, 2012. *OECD Guideline for Testing Chemicals. Test n.º 211: Daphnia magna reproduction test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD Publishing.
- OECD, 2013. *OECD Guideline for Testing Chemicals. Test n.º 236: fish embryo acute toxicity (FET) test*. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD Publishing.
- OKAMOTO, A.; YAMAMURO, M.; TATARAZAKO, N. Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, v. 35, n. 7, p. 824-830, 2014, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3078>.
- OLIVEIRA, R.; MCDONOUGH, S.; LADEWIG, J. C. L.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A.; DOMINGUES, I. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 36, p. 903-912, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019>.
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X).
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 123, p.291-298, 1984.
- PADILLA, S.; HUNTER, D. L.; PADNOS, B.; FRADY, S.; MACPHAIL, R. C. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, p. 624-630, 2011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2011.08.005>.
- PAPAGEORGIOU, I.; BROWN, C.; SCHINS, R.; SINGH, S.; NEWSON, R.; DAVIS, S.; FISHER, J.; INGHAM, E.; CASE, C. P. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, v. 28, p. 2946-2958, 2007, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.02.034>.
- PATRÍCIO-SILVA, A. L.; AMORIM, M. J. B. Effect of freeze-thaw cycles and 4-nonylphenol on cellular energy allocation in the freeze-tolerant enchytraeid *Enchytraeus albidus*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 3548-3555, 2016, <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5593-1>.
- PERES, L. A. B.; DELFINO, V. D. A.; MOCELI, A. J.; TUTIDA, L. A.; FÁVERO, M. E.; MATSUO, T. Padronização do teste do MTT em modelo de preservação a frio como instrumento de avaliação da viabilidade celular renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 30, n. 1, p. 48-53, 2008.
- PÉREZ, J.; DOMINGUES, I.; MONTEIRO, M.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, p. 4671-4680, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1443-6>.
- PESTANA, J. L. T.; BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. V. M. Predator threat assessment in *Daphnia magna*: the role of kairomones versus conspecific alarm cues. *Marine and Freshwater Research*, v. 64, p. 679-686, 2013, <https://doi.org/10.1071/MF13043>.
- PESTANA, J. L. T.; LOUREIRO, S.; BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. V. M. Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*, v. 78, p. 241-248, 2010, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.066>.
- PRABHAKARA RAO, P. G.; JYOTHIRMAYI, K.; ATYANARAYANA, A.; RAO, D. G. Effect of processing conditions on the stability of annatto (*Bixa orellana* L.) dye incorporated into some foods. *LWT - Food Science and Technology*, v. 8, p. 779-784, 2005, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.015>.
- PRATHUMPAI, W.; KOCHARIN, K.; PHIMMAKONG, K.; WONGSA, P. Effects of different carbon and nitrogen sources on naphthoquinone production of *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 223-232, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03259856>.
- PUNRATTANASIN, N.; NAKPATHOMB, M.; SOMBOONB, B.; NARUMOLB, N.; RUNGRUANGKITKRAIC, N.; MONGKHOLRATTANASI, R. Silk fabric dyeing with natural dye from

- mangrove bark (*Rhizophora apiculata* Blume) extract. *Industrial Crops and Products*, v. 49, p. 122-129, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.041>.
- REID, T. M.; MORTON, K. C.; WANG, C. Y.; KING, C. M. Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative systems. *Environmental Mutagenesis*, v. 6, p. 705-717, 1984, <http://dx.doi.org/10.1002/em.2860060508>.
- REN, Z.; LI, Z.; MA, M.; WANG, W.; FU, R. Behavioral Responses of *Daphnia Magna* to stresses of chemicals with different toxic characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 82, p. 310-316, 2009, <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9588-1>.
- RIMOLDI, D.; MILLER, A. C.; FREEMAN, S. E.; SAMID, D. DNA damage in cultured human skin fibroblasts exposed to excimer laser radiation. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 96, p. 898-902, 1991.
- RODGHER, S.; ESPÍNOLA, E. L. G.; LOMBARDI, A. T. Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity. *Ecotoxicology*, v. 19, p. 1027-1033, 2010, <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0484-1>.
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The principles of humane experimental technique*. 238 pp. London: Methuen, 1959.
- SCCNFP, 2001. Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning the Safety Review of the Use of Certain Azo-Dyes in Cosmetic Products, Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products, SCCNFP/0495/01.
- SCCS. *Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety Opinion on Basic Red 51*. Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS/1436/11, 2011.
- SCHOLZ, S. Zebrafish embryos as an alternative model for screening of druginduced organ toxicity. *Archives of Toxicology*, v. 87, p.767-769, 2013, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1044-2>, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1044-2>.
- SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.; VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 15, p. 394-404, 2008, <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>.
- SCHOOP, V. M.; MIRANCEA, N.; FUSENIG, N. E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 112, p. 343-353, 1999, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x>.
- SELDERSLAGHS, I. W. T.; HOOYBERGHS, J.; COEN, W.; WITTERS, H. E. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 32, p. 460-471, 2010, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.002>.
- SHAHID, M.; UL-ISLAM, S.; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*, v. 53, p. 310-331, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.03.031>.
- SHARMA, P.; KAUR, H.; SHARMA, M.; SAHORE, V.; A review on applicability of naturally available adsorbents for the removal of hazardous dyes from aqueous waste. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 183, p. 151–195, 2011, <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-011-1914-0>.
- SILVA, M. C.; SOUZA, V. B.; THOMAZINI, M.; SILVA, E. R.; SMANIOTTO, T.; CARVALHO, R. A.; GENOVESE, M. I.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Use of the jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) depulping residue to produce a natural pigment powder with functional properties. *LWT -Food Science and Technology*, v. 55, p. 203-209, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.026>.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SMOLDERS, R.; BERVOETS, L.; DE COEN, W.; BLUST, R. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution*, v. 129, p. 99-112, 2004, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.027>.
- SMOLDERS, R.; 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. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220429>.

- SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 681, p. 3-12, 2009, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.005>.
- STANLEY, J. K.; LAIRD, J. G.; KENNEDY, A. J.; STEEVENS, J. A. Sublethal effects of multiwalled carbon nanotube exposure in the invertebrate *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 1, p. 200-204, 2016, <https://doi.org/10.1002/etc.3184>.
- STRAHLE, U.; SCHOLZ, S.; GEISLER, R.; GREINER, P.; HOLLERT, H.; RASTEGAR, S.; SCHUMACHER, A.; SELDERSLAGHS, I.; WEISS, C.; WITTERS, H.; BRAUNBECK, T. 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, n. 2, p.128-132, 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>.
- TAFURT-CADORNA, Y.; SUARES-ROCHA, P.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxic and genotoxic effects of two hair dyes used in the formulation of black color. *Food and Chemical Toxicology*, v. 86, p. 9-15, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.010>.
- TERREDAS, M.; MARTÍN, M.; TUSELL, L.; GENESCÀ, A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research*, v. 705, p. 60-67, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.03.004>.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 306-221, 2000, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:33.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:33.0.CO;2-J).
- TIMBRELL, J. A. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, v. 129, p. 1-12, 1998.
- TRAUDT. Effect of age on acute toxicity of cadmium, copper, nickel, and zinc in individual-metal exposures to *Daphnia magna* neonates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, p. 113-119, 2016, <https://doi.org/10.1002/etc.3507>.
- UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; OLIVEIRA, D. P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais river. *Chemosphere*, v. 60, p. 55-64, 2005, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.100>.
- UNAGUL, P.; WONGSA, P.; KITTA KOOP, P.; INTAMAS, S.; SRIKITIKULCHAI, P.; TANTICHAROEN, M. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 32, p. 135-140, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-005-0213-6>.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Guidelines for carcinogen risk assessment*. Washington, 2015. Disponível em: <http://www2.epa.gov/risk>.
- VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, p. 178-189, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>.
- VALENT, G. U.; SATO, M. I. Z.; COELHO, M. C. L. S.; COIMBRÃO, C. A.; SANCHEZ, P. S.; MARTINS, M. T.; BONATELLI JR., R. Monitoring São Paulo State rivers in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. *Environmental Toxicology and Water Quality*, v. 8, p. 371-381, 1993.
- VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L. L.; LHUGUENOT, J. C.; BON, A. M. L.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct ou indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*, v. 536, p. 79-90, 2003.
- VAN BOXTEL, A. L.; KAMSTRA, J. H.; FLUITSMA, D. M.; LEGLER, J. Dithiocarbamates are teratogenic to developing zebrafish through inhibition of lysyl oxidase activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 244, p. 156-161, 2010, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.028>.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003, [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).
- VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, v. 28, p. 711-717, 2003, [http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00116-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00116-2).

- VELMURUGAN, P.; KAMALA-KANNAN, S.; BALACHANDAR, V.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J. C.; OH, B. T. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 262-268, 2010, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.058>.
- VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, v. 26, p. 11-17, 2011, <https://doi.org/10.1093/mutage/geq078>.
- XIAO, J. H.; ZHONG, J. J. Secondary metabolites from *Cordyceps* species and their antitumor activity studies. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 1, p. 123-137, 2007, <http://dx.doi.org/10.2174/187220807780809454>.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações. (Eds.) 1 ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima, p.347-382, 2006.
- ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. *Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. 1. Ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.
- ZANONI, T. B.; LIZIER, T. M.; ASSIS, M. D.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. CYP-450 isoenzymes catalyze the generation of hazardous aromatic amines after reaction with the azo dye Sudan III. *Food and Chemical Toxicology*, v. 57, p. 217-226, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.035>.
- ZANONI, T. B.; TIAGO, M.; FAIÃO-FLORES, F.; BARROS, S. B. M.; BAST, A.; HAGEMAN, G.; OLIVEIRA, D. P.; MARIA-ENGLER, S. S. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). *Toxicology Letters*, v. 227, p. 139-149, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.03.007>.
- ZANONI, T. B.; TIAGO, M.; FAIÃO-FLORES, F.; BARROS, S. B. M.; BAST, A.; HAGEMAN, G.; OLIVEIRA, D. P.; MARIA-ENGLER, S. S. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). *Toxicology Letters*, v. 227, p.139-149, 2014, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.03.007>.
- ZHANG, J.; CHEN, S.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; ZHAO, H.; ZHANG, Y. Reduction of acute toxicity and genotoxicity of dye effluent using Fenton-coagulation process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 274, p. 198-204, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.022>.
- ZHANG, W.; LIU, W.; ZHANG, J.; ZHAO, H.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; JIN, Y. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. *Journal of Environmental Sciences*, v. 24, p. 2019-2027, 2012, [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)61030-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)61030-9).
- ZHIVOTOVSKY, B.; SAMALI, A.; GAHM, A.; ORRENIUS, S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, v. 6, p. 644-651, 1999, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400536>.
- ZHOU, D-Y.; ZHU, B-W.; WANG, X-D, QIN, L.; LI, D-M.; MIAO, L.; MURATA, Y. Stability of polyhydroxylated 1,4-naphthoquinone pigment recovered from spines of sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, p. 1479-1486, 2012, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02995.x>.
- ZOLLINGER, H. *Color chemistry. Syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. 3 ed. revisada. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich: Suíça. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim: Alemanha, v. 43, p. 5291-5292, 2003, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200385122>.