



# Efeitos de três corantes azo dispersos nos primeiros estágios da vida do peixe-zebra

Helen Cristina Reis\*, Gisela A. Umbuzeiro °, Rhaul Oliveira ■

hln.reis@hotmail.com \*, giselau@ft.unicamp.br °, rhaul.oliveira@gmail.com ■

Faculdade de Tecnologia, UNICAMP, Rua Paschoal Marmo, 1888, 13484-332 Limeira, SP, Brasil

## 1. Introdução

Os corantes estão presentes na maioria dos produtos que utilizamos no dia a dia. Cerca de 1.000.000 de toneladas de corantes são produzidos a cada ano para atender a demanda mundial (Burkinshaw e Salihi 2013). Os corantes dispersos representam aproximadamente 22% do consumo mundial de corantes (Zocolo et al. 2015). Esta classe representa corantes aplicados em poliéster, poliamida, acetato acrílico e plásticos, a partir de finas dispersões aquosas (Hunger 2003). Além da classificação quanto ao uso, os corantes também podem ser classificados de acordo com sua estrutura química. Os corantes azo, por exemplo, são compostos por moléculas contendo pelo menos um grupo azo ( $-N=N-$ ) (Hunger 2003). Esta é a classe mais importante, uma vez que os corantes azo representam 65% dos corantes comerciais disponíveis (Zanoni e Yanamaka 2016).

Durante a produção, fixação ao substrato e uso, uma quantidade considerável de corantes é perdida e concentrada nos efluentes industriais e domésticos. Devido à alta persistência e a má remoção por tratamentos convencionais de efluentes os corantes ou seus produtos de degradação chegam aos ecossistemas aquático podem desencadear efeitos deletérios à biota (Zanoni e Yanamaka 2016).

A avaliação da toxicidade de compostos químicos é uma etapa importante da avaliação de risco. Embriões de *Danio rerio* são um modelo alternativo interessante para avaliação de toxicidade de químicos em vertebrados. Possuem tamanho pequeno, ciclo de vida curto, alta taxa de fertilidade e fácil cultivo quando comparado a outros organismos modelo. São transparentes durante a fase embrionária, o que facilita a visualização dos órgãos internos. Embora um protocolo padronizado para o teste de toxicidade do embrião de peixe (FET) já tenha sido publicado pela OCDE em 2013 (OCDE 2013), existem poucos estudos na literatura avaliando a toxicidade de corantes para embriões de peixe-zebra.



**Imagem 1.** Embrião de peixe-zebra



**Imagem 2.** Larva de peixe-zebra



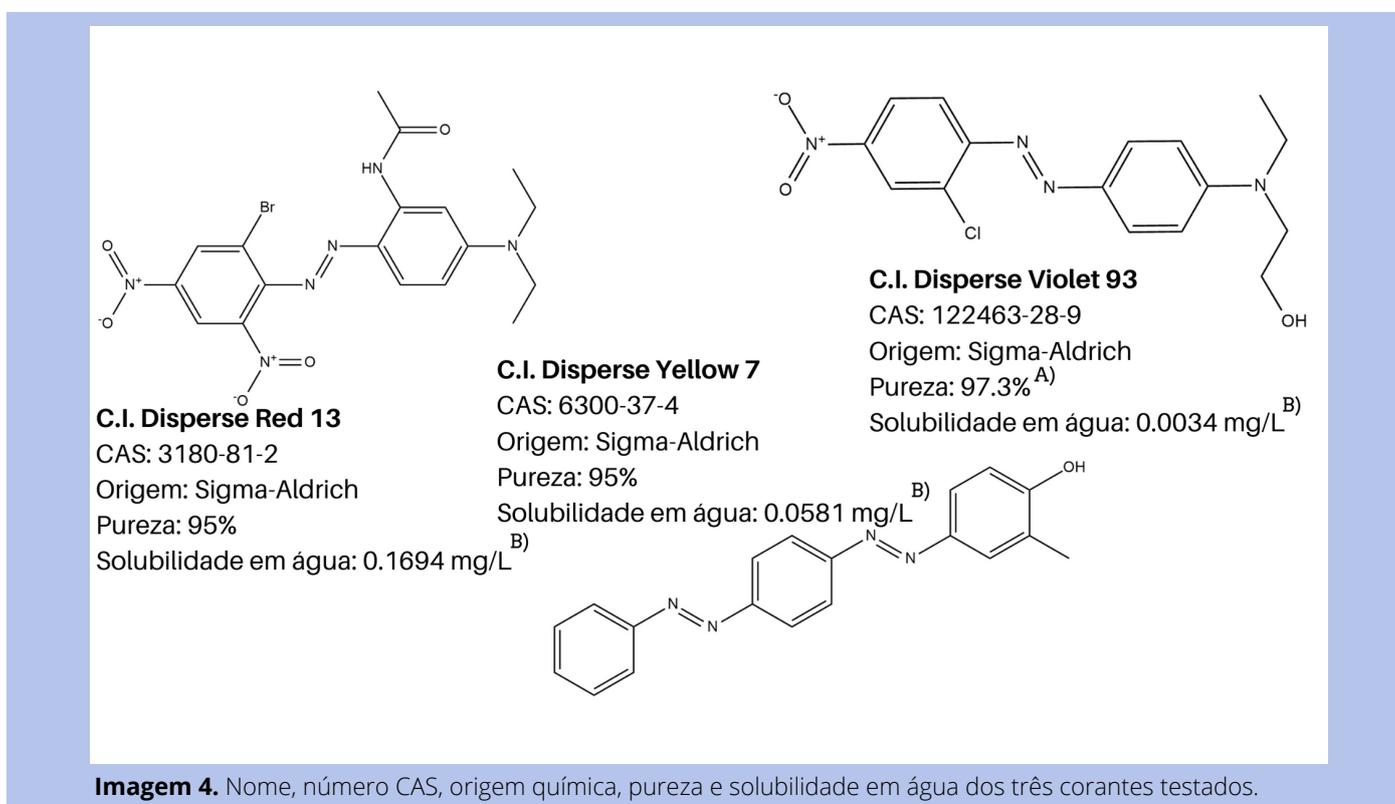
**Imagem 3.** Peixe-zebra adulto



Existem alguns registros na literatura sobre a ocorrência ambiental de Disperse Violet 93, Disperse Yellow 7 e Disperse Red 13, três corantes azo dispersos (Carneiro et al. (2010), Vacchi et al. (2017), Zocolo et al. (2015)), o que mostra que eles estão presentes no compartimento aquático. Também existem alguns estudos sobre a toxicidade do corante de Disperse Red 13 e Disperse Violet 93, mas não há informações sobre sua toxicidade para embriões de vertebrados aquáticos. Além disso, existem apenas dois estudos sobre a toxicidade de Disperse Yellow 7 para vertebrados aquáticos (larvas de *Silurana tropicalis* e para embriões e larvas de *Fathead Minnow*) (Mathieu-Denoncourt et al. 2014; Parrott, Bart e Balakrishnan 2016). Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a toxicidade desses 3 corantes nos estágios iniciais de vida do peixe-zebra.

## 2. Materiais e Métodos

C.I. Disperse Red 13, C.I. Disperse Yellow 7 e C.I. Disperse Violet 93 foram usados para testes de toxicidade (Figura 1). Para o controle de solvente, dimetil sulfóxido (DMSO) foi usado, adquirido da Sigma-Aldrich (CAS: 67-68-5), enquanto 3,4-Dicloroanilina foi usada para controle positivo, também adquirido da Sigma-Aldrich (CAS: 95-76-1).



**Imagem 4.** Nome, número CAS, origem química, pureza e solubilidade em água dos três corantes testados.

A) representa compostos purificados por Umbuzeiro et al. (2017); B) representa a solubilidade em água predita pela Plataforma ACD / Labs.



O ensaio foi realizado seguindo as diretrizes do Fish Embryo Toxicity Test (OECD, 2013). Como os corantes possuem baixa solubilidade em água, DMSO foi utilizado para preparar as soluções. Diluições sucessivas foram utilizadas para obter as cinco concentrações finais de cada corante, sendo elas: 0,6, 1,2, 2,5, 5 e 10 mg/L, distribuídas em placas de 24 poços. Também foi utilizado controle solvente (não excedendo a concentração 100 µl/L), controle positivo, contendo 4 mg/L de 3,4-Dichloroaniline, bem como um controle negativo, composto somente pela água de cultivo dos peixes.

Antes da eclosão, os seguintes parâmetros foram avaliados: coagulação do ovo, formação de otólito, atraso geral no desenvolvimento, pigmentação do olho e do corpo, formação de somito, batimento cardíaco, edemas, desprendimento da cauda do saco vitelino, absorção do saco vitelino e eclosão. Após a eclosão, a malformação da coluna vertebral, a inflação da bexiga natatória e embriões sem equilíbrio (deitado de lado no fundo do poço da microplaca) também foram avaliados. Todos os parâmetros foram avaliados de forma qualitativa (observados ou não observados).

As concentrações efetivas (EC50 e LC50) foram calculadas usando os dados letais (mortalidade) e subletais (equilíbrio e anormalidades de desenvolvimento) experimentais. O conjunto de dados obtido a partir do teste FET foi ajustado em um modelo logístico de 4 parâmetros por meio de uma planilha construída no Microsoft Excel. O pacote estatístico SigmaStat 3.5 foi usado para comparação entre os grupos (SPSS, 2004).

### 3. Resultados e Discussões

Não foram observadas alterações significativas no pH, oxigênio dissolvido e dureza das soluções testadas. A precipitação foi observada todos os dias a partir da segunda concentração testada de C.I. Disperse Red 13 (1,2 mg/L). Nenhuma precipitação foi observada em qualquer concentração testada de C.I. Disperse Violet 93, enquanto a precipitação foi observada todos os dias a partir da primeira concentração testada de C.I. Disperse Yellow 7 (0,6 mg/L). Portanto, os resultados discutidos a seguir referem-se a experimentos com suspensões de corantes, o que anula os resultados encontrados para DR13 e DY7. Além disso, devido à crise pandêmica COVID 19, apenas uma réplica foi realizada para cada experimento.

#### 3.1 C.I. Disperse Violet 93

Nenhuma mortalidade significativa foi observada nos organismos expostos por 168h ao C.I. Disperse Violet 93 na concentração máxima testada. Em 48 horas de exposição, a taxa de batimento cardíaco foi maior para organismos expostos a 5 e 10 mg/L de DV93 quando comparados ao grupo controle. De 120h a 168h de exposição, vinte por cento do organismo exposto a 1,2 mg/L de DV93 apresentaram edema e curvatura anormal da cauda. Na mesma concentração de teste, a absorção do saco vitelino foi afetada em 20% dos embriões, com 120h e 144h de exposição. Nenhum estudo foi encontrado na literatura usando modelos de vertebrados para avaliar a toxicidade DV93.



A mutagenicidade deste corante já foi relatada usando o ensaio de *Salmonella* (Umbuzeiro et al. 2005; Vacchi et al. 2017). Em estudo com *Daphnia similis* não foram encontrados efeitos agudos em organismos expostos a concentrações de até 20 µg/L de DV93 (Umbuzeiro et al. 2017).

#### 4. Considerações finais

Foram testadas concentrações acima da solubilidade em água dos três corantes, o que causou a precipitação do corante. Portanto, os testes realizados neste projeto não são válidos. A precipitação de compostos químicos em testes de toxicidade pode influenciar os resultados apresentados. Assim, ao constatar tal ocorrência, é necessário alterar a técnica empregada. Outras técnicas devem ser utilizadas para avaliar a toxicidade dos corantes DY7 e DR13. A dosagem passiva, por exemplo, é uma boa alternativa, pois o corante estará disponível no meio em quantidade igual ao seu limite de solubilidade.

#### Agradecimentos

Agradeço à PIBIC, pela bolsa de pesquisa, ao Prof. Rhaul e a Profa. Gisela pela orientação e à equipe do LAEG, por todos os ensinamentos e apoio.

#### Referências

- Burkinshaw, S. M. and G. Salihu. 2013. "Dyes and Pigments The Wash-off of Dyeings Using Interstitial Water. Part 4: Disperse and Reactive Dyes on Polyester / Cotton Fabric." *Dyes and Pigments* 99(3):548–60.
- Carneiro, Patricia A., Gisela A. Umbuzeiro, Danielle P. Oliveira, and Maria Valnice B. Zanoni. 2010. "Assessment of Water Contamination Caused by a Mutagenic Textile Effluent/Dyehouse Effluent Bearing Disperse Dyes." *Journal of Hazardous Materials* 174(1–3): 694–99.
- Hunger, K. (2003). *Industrial Dyes*. Wiley-VCH.
- Mathieu-Denoncourt, Justine, Christopher J. Martyniuk, Shane R. De Solla, Vimal K. Balakrishnan, and Valérie S. Langlois. 2014. "Sediment Contaminated with the Azo Dye Disperse Yellow 7 Alters Cellular Stress- and Androgen-Related Transcription in *Silurana tropicalis* Larvae." *Environmental Science and Technology* 48(5):2952–61.
- OECD. (2013). Fish embryo toxicity (FET) test. *Organization for Economic Co-Operation and Development*, Paris, (July), 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Parrott, Joanne L., Adrienne J. Bartlett, and Vimal K. Balakrishnan. 2016. "Chronic Toxicity of Azo and Anthracenedione Dyes to Embryo-Larval Fathead Minnow." *Environmental Pollution* 210:40–47.



- Umbuzeiro, Gisela A. de Aragão, Malgorzata Szymczyk, Min Li, Yufei Chen, Josiane A. S. Vendemiatti, Anjaina F. de Albuquerque, Amanda dos Santos, Bianca de S. Maselli, Fábio Kummrow, Nelson R. Vinueza, Harold S. Freeman, Guilherme J. uliã. Zocolo, Glauco Pilon dos Santos, Josiane A. S. Vendemiatti, Francine I. nforçat. Vacchi, Gisela A. de Aragão Umbuzeiro, and Maria V. alnic. Boldrin Zanoni. 2017. "Using SPE-LC-ESI-MS/MS Analysis to Assess Disperse Dyes in Environmental Water Samples." *Journal of Chromatographic Science* 53(8):513–18.
- Umbuzeiro, Gisela A., Malgorzata Szymczyk, Min Li, Yufei Chen, Josiane A. S. Vendemiatti, Anjaina F. de Albuquerque, Amanda dos Santos, Bianca de S. Maselli, Fábio Kummrow, Nelson R. Vinueza, and Harold S. Freeman. 2017. "Purification and Characterization of Three Commercial Phenylazoaniline Disperse Dyes." *Coloration Technology* 133(6):513– 18.
- Vacchi, Francine Inforçato et al. 2017. "Quantifying the Contribution of Dyes to the Mutagenicity of Waters Underthe Influence of Textile Activities." *Science of the Total Environment*: 230–36.
- Zanoni, Maria Valnice Boldrin and Hideko Yanamaka. 2016. *Corantes: Caracterização Química, Toxicológica, Métodos de Detecção e Tratamento*.
- Zocolo, Guilherme J.ulião et al. 2015. "Using SPE-LC-ESI-MS/MS Analysis to Assess Disperse Dyes in Environmental Water Samples." *Journal of chromatographic science* 53(8): 1257– 64.