

## Avaliação da toxicidade corantes dispersos por meio da técnica de dosagem passiva utilizando embriões de peixe-zebra

**Palavras chave:** embriotoxicidade, corantes dispersos, *Danio rerio*, ecotoxicologia.

Jéssica Carolina Silva Oliveira\*, Gisela A. Umbuzeiro<sup>o</sup>, Rhaul Oliveira<sup>▪</sup>  
j218489@dac.unicamp.br\*, giselau@ft.unicamp.br<sup>o</sup>, rhaul.oliveira@gmail.com<sup>▪</sup>

Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade - LAEG

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

### 1. Introdução

Os corantes estão presentes na maioria dos produtos que usamos em nosso cotidiano, cerca de 1.000.000 de toneladas de corantes são produzidos todos os anos e novos corantes são continuamente desenvolvidos (Burkinshaw e Salihu, 2013).

Sendo assim, ecossistemas aquáticos podem ser impactados por corantes, pois durante a produção, fixação ao substrato e uso, uma quantidade considerável desses é perdida, sendo concentrada nos efluentes. Vários corantes de uso industrial têm alta persistência e baixa taxa de remoção nos tratamentos convencionais de águas residuais. Como consequência, os corantes são continuamente liberados no ambiente aquático, sendo cada vez mais detectados nos monitoramentos de águas superficiais e sedimentos (Vacchi et al., 2017; De Oliveira et al., 2016).

Com potencial para afetar organismos que lá residem (Zanoni e Yamanaka, 2016) e ainda pouco estudados do ponto de vista ecotoxicológico, os corantes são considerados poluentes emergentes prioritários na toxicologia ambiental. São vários os desafios para a avaliação de toxicidade aquática de corantes, em especial dos corantes da classe dos dispersos, pois esses possuem baixa solubilidade em água. O estudo de toxicidade aquática de substâncias químicas pouco solúveis em água apresenta vários desafios, dentre eles é destacado a dificuldade na manutenção do nível de exposição inicial ao longo de um teste de toxicidade desde a preparação das soluções em meio aquoso e uso de solventes até as perdas de massa do composto em fase aquosa devido a adsorção aos recipientes do teste e a absorção pelos próprios organismo-teste (Mayer et al., 1999).

O método da dosagem passiva tem se destacado dentre as metodologias que podem ser empregadas para o teste de substâncias de baixa solubilidade em água (Smith et al., 2010). Apesar de ser um método promissor, ainda são necessários estudos para a padronização com diferentes organismos modelo utilizados na toxicologia aquática.

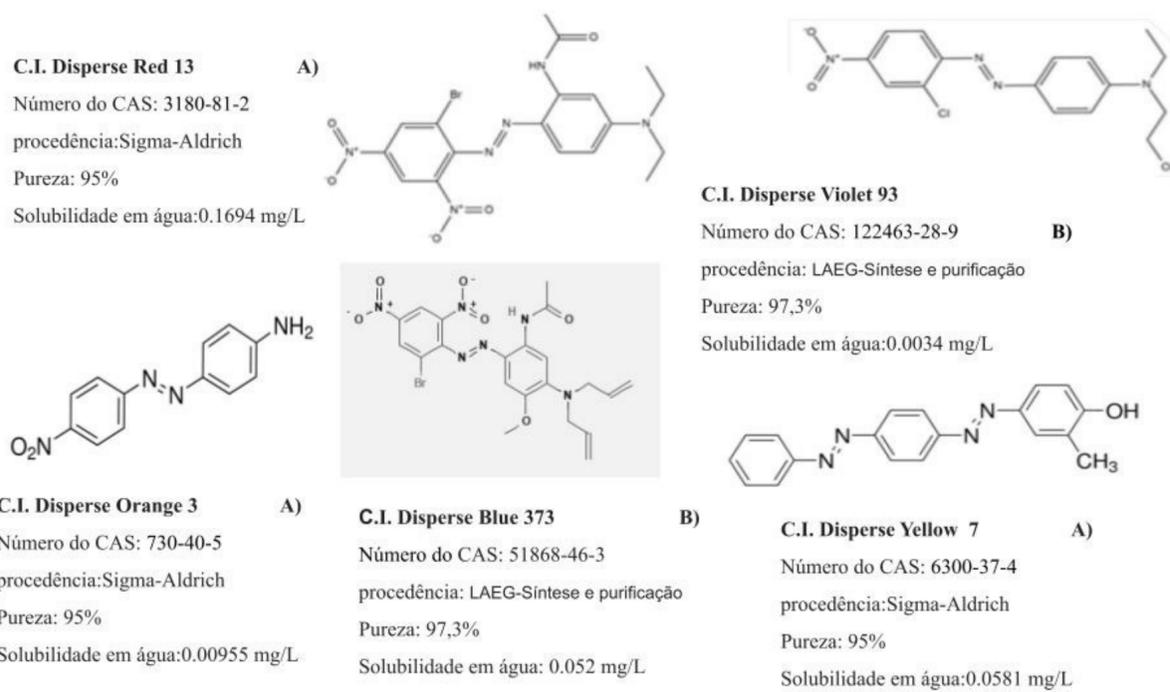
A escolha do organismo modelo é um passo importante para a avaliação de toxicidade. Embriões de *Danio rerio* são um modelo alternativo interessante, pois esse é transparente durante o estágio embrionário, dessa forma, é possível observar in vivo o desenvolvimento de órgãos internos, batimento cardíaco, comportamento, dentre outros parâmetros morfofisiológicos os quais podem analisados no intuito de elucidar os efeitos e mecanismos de toxicidade de químicos em peixes (Scholz et al., 2018).

Em 2018, já havia sido padronizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG-UNICAMP) um protocolo para o uso do método de dosagem passiva na avaliação de toxicidade química com a *Daphnia Similis*, um invertebrado aquático amplamente adotado como organismo modelo na toxicologia ambiental, restando a lacuna de padronização do método para outros organismos modelo, em especial vertebrados. Assim, nesse projeto foi realizada preparação das condições e procedimentos para avaliação da toxicidade de corantes dispersos em embriões de peixe-zebra por meio da metodologia da dosagem passiva.

### 2. Material e métodos

#### 2.1 Compostos químicos

Os corantes dispersos C.I. Disperse Red 13 (DR13), C.I. Disperse Yellow7 (DY7), C.I. Disperse Violet 93 (DV93), C.I. Disperse Blue 373 (DB373), C.I. Disperse Orange 3 (DO3) foram usados para toxicidade testes (Figura 1). Para o controle de solvente, metanol foi usado, adquirido da Sigma-Aldrich (CAS: 67-68-5).



**Figura 1:** Nome, número CAS, origem química, pureza e solubilidade em água dos 5 corantes utilizados em testes preliminares com embriões de peixe-zebra. A) representa a solubilidade em água prevista usando o Plataforma ACD/ Labs; B) representa compostos purificados por Umbuzeiro et al. (2017).

## 2.2 Comitê de ética

Os testes de toxicidade foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Biologia - UNICAMP (protocolo número: 5646-1/2020).

## 2.3 Cultivo peixe-zebra

Adultos de *D. rerio* foram mantidos no Biotério de Peixes-zebra da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP, campi Limeira-SP. Esse conta com um sistema recirculante composto por cinco aquários e sistema de filtros incluindo carvão ativado, osmose reversa e biológico. A sala de cultivo tem fotoperíodo (12:12 h, claro:escuro) e temperatura ( $24 \pm 2$  °C) controlados. Após a filtragem por carvão e membranas de osmose a água é reconstituída com sal marinho (Red Sea) e os parâmetros físico-químicos são diariamente controlados: a temperatura foi mantida em  $26,0 \pm 1$  °C, amônia < 0,01 mg/L, condutividade em  $750 \pm 50$   $\mu$ S/cm, pH  $7,5 \pm 0,5$  e o oxigênio dissolvido igual ou superior a 95 % de saturação. Essas condições físico-químicas da água foram adotadas também em todos os experimentos realizados com embriões.

## 2.4 Preparação e carregamento dos anéis

A metodologia da dosagem passiva envolve 4 diferentes etapas: limpeza dos anéis de polidimetilsiloxano (PDMS, doação recebida de EDA/WANA-UFZ, <https://www.ufz.de/>), carregamento, equilíbrio na solução teste e, por fim, exposição dos organismos.

A limpeza dos anéis foi realizada em frascos de vidro contendo 20 mL de metanol em agitação (100 rpm) por 24 h. Após esse período, os anéis foram enxaguados com água Mili-Q, eliminando o metanol da superfície do PDMS, e secos com papel sem fiapos e reservados para uso.

O carregamento dos anéis foi realizado com soluções estoques individuais de cada corante. Essas foram preparadas em metanol com concentração de 500 mg/L para todos os corantes testados. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de cada uma das soluções estoques, em quadruplicada, para os tubos-teste com capacidade para 20 mL. Nesses tubos já se encontrava inserido um anel de PDMS. Para o controle negativo os anéis foram carregados apenas com metanol sem a presença de corantes. Uma vez adicionadas todas as soluções estoques iniciou-se a adição gradativa de água Mili-Q nos tubos até atingir um volume final total de 20 ml (1 ml de solução estoque + 19 ml de água mili-Q). Sendo pipetadas 100  $\mu$ L de água, 10 vezes, uma a cada 10 minuto, e depois, 18 vezes, 1 mL de água Mili-Q, também a cada 10 minutos. Ao adicionar água gradativamente induz-se o corante a migrar da fase aquosa para o anel de PDMS.

Cada tubo foi tampado com uma camada de papel alumínio com um pequeno furo no centro, através do qual foram adicionadas as frações de água, visando evitar possível volatilização do composto. Toda a etapa de carregamento ocorreu em agitação a 100 rpm, e os anéis foram deixados nessas condições overnight para completar o carregamento.

Uma vez carregados os anéis foram retirados dos tubos com o auxílio de uma pinça metálica, gentilmente lavados com água mili-Q, e enxugados com papel sem fiapos. Esses foram imediatamente inseridos em outro conjunto de tubos de vidro contendo 20 ml de meio de teste para embriões de peixe-zebra e deixados em agitação (100 rpm), protegidos da luz, por 24 h.

### 2.5 Exposição dos agentes químicos e monitoramento do desenvolvimento dos embriões.

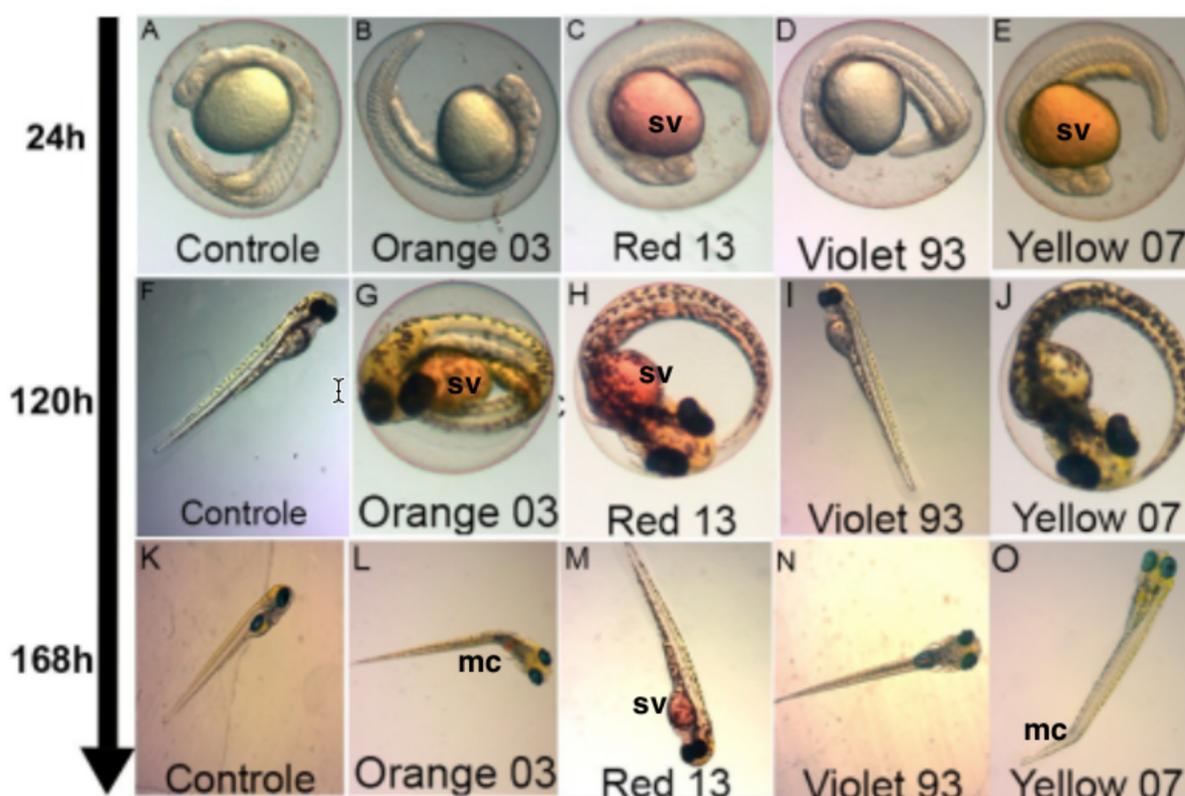
Os ovos de peixe-zebra usados nos experimentos foram coletados imediatamente após o acasalamento natural, lavados com o meio de teste. Organismos viáveis para o teste foram selecionados no estereomicroscópio e os ovos não fertilizados e aqueles com irregularidades de clivagem ou lesões foram descartados (Estereomicroscópio STEMI 2000 C - Zeiss). E por fim, foram adicionados 10 ovos de peixe-zebra em cada uma das 4 réplicas por concentração, por corante, as quais continham o corante já em equilíbrio entre solução de exposição e os anéis. O teste condicionado a  $26,0 \pm 1$  °C, no escuro e mantido em agitação (100 rpm) durante 168 horas.

### 2.6 Avaliação dos embriões

Os embriões foram observados diariamente em um estereomicroscópio. Os parâmetros de desenvolvimento avaliados antes da eclosão foram: coagulação do ovo, formação de otólito, atraso geral no desenvolvimento, pigmentação do olho e do corpo, formação de somito, batimento cardíaco, edemas, desprendimento do botão da cauda do saco vitelino, absorção do saco vitelino e eclosão. Após a eclosão, malformação da coluna vertebral, inflamação da bexiga natatória e equilíbrio também foram avaliados. Todos os parâmetros foram avaliados de forma qualitativa (observados ou não observados).

## 3. Resultados e Discussão

Os parâmetros físicos e químicos do meio do cultivo e das soluções ao final do teste foram analisados e não foram observadas alterações significativas no pH, condutividade, dureza ou oxigênio dissolvido. Após 168 h de exposição, nenhuma mortalidade significativa ou anormalidades de desenvolvimento foram observadas no organismo exposto ao C.I. Disperse DR13, C.I. Disperse D03 e o C.I. Disperse DV93 quando em comparação ao grupo controle.



**Figura 2.** Teste de toxicidade via dosagem passiva com embriões de peixe-zebra expostos durante 168 h à soluções controle, contendo somente meio de cultivo, C.I. Disperse Orange 3, C.I. Disperse Red 13, C.I. Disperse Violet 93, C.I. Disperse Yellow 07. sv: absorção do corante no saco vitelino, mc: malformação da cauda.

Após 24 h de exposição foi observada a mortalidade de todos os embriões expostos ao C.I. Disperse DB373. Entre 120 h a 168 h de exposição, 10 % dos organismos expostos, aos C.I. Disperse DV93 e C.I. Disperse DY07, apresentaram edema, curvatura anormal da cauda e perda de equilíbrio (Figura 2). O acúmulo de corantes nos sacos vitelínicos dos embriões também pode ser observada para os corantes C.I. Disperse D03, C.I. Disperse DR13 e C.I. Disperse DY07.

#### 4. Considerações finais

Os dados obtidos reforçam a aplicabilidade do método de dosagem passiva para avaliação de toxicidade de corantes utilizando embriões de peixe-zebra. O aumento na mortalidade e nas anormalidades no desenvolvimento, observados para o DB373 e DY07, são um claro indicativo de aplicabilidade da metodologia. Entretanto, mais réplicas experimentais e o refinamento das concentrações exposição são necessárias para corroborarmos esse pressuposto.

#### Agradecimentos

Agradeço à PIBIC, pela bolsa de pesquisa, ao Prof. Rhaul e a Profa. Gisela pela orientação, Natália O. de Farias pela assistência na montagem e análise dos teste 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.

VACCHI, Francine Inforçato et al. Quantifying the contribution of dyes to the mutagenicity of waters under the influence of textile activities. *Science of the Total Environment*, v. 601, p. 230-236, 2017.

ZANONI, Maria VB; YAMANAKA, Hideko. *Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. Ed. Cultura Acadêmica, 2016.

DE OLIVEIRA, Danielle Palma; KUHLMANN, Mônica Luisa; DE ARAGÃO UMBUZEIRO, Gisela. Evaluation of the presence of mutagenic dyes in sediments from Cristais River. *Soil & Sediment Contamination*, v. 15, n. 5, p. 455-462, 2006.

SCHOLZ, Stefan et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental science and pollution research*, v. 15, n. 5, p. 394-404, 2008.

MAYER, P. et al. Establishing and controlling dissolved concentrations of hydrophobic organics by partitioning from a solid phase. *Environmental Science and Technology*, v. 33, n.13, p. 2284–2290, 1999.

SMITH, K. E. C. et al. Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing. *Aquatic toxicology*, v. 98, p. 15-24, 2010.

ZWARG, José. Implementação da técnica de dosagem passiva em estudos de ecotoxicidade. 2018, Curso de Bacharel em Engenharia Ambiental. Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, p. 16- 21, 2021.

RODRIGUES, M. V. Qualidade de vida no trabalho. 1989. 180 f. Dissertação (Mestrado em Administração) - Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.

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.