



## Avaliação da genotoxicidade do corante emodin modificado utilizando um organismo aquático

**Palavras-Chave:** Ensaio Cometa, *Parhyale hawaiiensis*, mutagenicidade

**Autores(as):**

**Amanda Rocha Rodrigues, FT - UNICAMP**

**Gabriel Rampazzo Magalhães (Coorientador), FT - UNICAMP**

**Marina Tenório Botelho (Coorientadora), FT - UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisela de Aragão Umbuzeiro (Orientadora), FT - UNICAMP**

---

### INTRODUÇÃO:

Os processos convencionais de tingimento utilizados pelas indústrias têxteis consomem até 150 litros de água para cada quilograma de fibra tingida (ZHENG, 2016). Como alternativa, há os processos que não utilizam água (*waterless*), como dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) e plasma atmosférico. No primeiro processo, o solvente utilizado é o dióxido de carbono no estado supercrítico, sendo um gás inerte que, em altas pressões e temperaturas, se dissolve e tingem os materiais (RÄISÄNEN, MONTERO, FREEMAN, 2021). Já o tingimento por plasma atmosférico ocorre quando descargas elétricas sob pressão atmosférica geram um gás parcialmente ionizado (plasma) que reage com a superfície do material, alterando suas propriedades físicas e químicas, fazendo com que o corante seja facilmente absorvido pelo substrato (ELABID *et al*, 2016).

O emodin é um corante natural pertencente ao grupo das antraquinonas e que apresentou boa fixação no tingimento de fibras termoplásticas e naturais por meio do SC-CO<sub>2</sub> (RÄISÄNEN, 2019). Entretanto, para ser utilizado no plasma atmosférico, seria necessário um grupo acrilóil. Esse corante apresentou toxicidade e mutagenicidade, *in vivo* e *in vitro*, para diversos organismos, devido à sua estrutura planar (DONG *et al*, 2016; HE *et al*, 2012; BROWN, BROWN, 1976; NESSLANY *et al*, 2009).

O projeto BioColour ([www.biocolour.fi](http://www.biocolour.fi)) é um consórcio internacional em que estão sendo desenvolvidos corantes naturais e novas aplicações, objetivando desenvolver alternativas ao uso dos corantes sintéticos. No Brasil, é representado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisela de Aragão Umbuzeiro, que coordenou o projeto ToxBioColour (Processo Fapesp n° 2020/04628-8). Esse projeto teve por objetivo caracterizar a toxicidade de corantes naturais considerados promissores, utilizando organismos aquáticos em ensaios de toxicidade aguda e crônica e de genotoxicidade *in vivo*. Perante a esses projetos e visando remover a mutagenicidade do emodin, além de permitir seu uso no processo de tingimento por plasma atmosférico, a substância passou por um processo de modificação química por meio da incorporação do grupo acrilóil à estrutura molecular no emodin, pelo Dr. Harold Freeman, que também faz parte do BioColour, e é do *Wilson College of Textiles*, da *North Carolina State*

University. Desta forma, o presente projeto tem como objetivo avaliar a genotoxicidade *in vivo* das modificações do corante emodin utilizando o organismo *Parhyale hawaiiensis*.

## METODOLOGIA:

### 1. Derivatização do emodin

O grupamento etóxi de acrilóila foi incorporado nos grupos -OH do emodin, gerando dois derivados, o Em-DR1 e Em-DR2 (Figura 1).

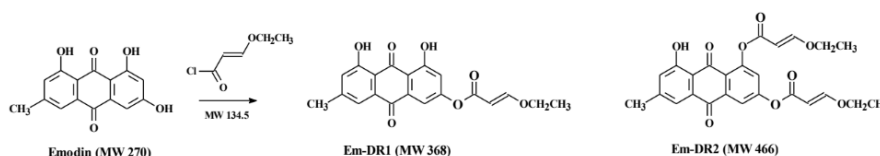


Figura 1. Reação de modificação do emodin e seus produtos, Em-DR1 e Em-DR2. FONTE: Prof. Dr. Harold Freeman

Os corantes foram dissolvidos em DMSO no seu limite de solubilidade e testados em 0,01% de DMSO, de acordo com a OECD (2019). Desta forma, o emodin foi testado nas concentrações de 0,15 e 0,30 mg/L, enquanto o Em-DR1 em 0,075 e 0,15 mg/L e o Em-DR2 0,3 e 1,25 mg/L. As soluções foram preparadas em água salina.

### 2. Ensaio Cometa

O ensaio cometa alcalino foi realizado a partir de adaptações de Lacaze *et al.* (2010) e recomendações de Møller *et al.* (2020). Os ensaios foram feitos com o emodin, seus derivados (Em-DR1 e Em-DR2) e DMSO 0,1% e 1%. Como controle positivo utilizou-se o EMS 2 mM (metanossulfonato de etila) e, como controle negativo para os testes com os corantes utilizou-se o DMSO 0,01% e, para os testes com DMSO, água salina.

Os cometas foram observados nos hemócitos que são células presentes na hemolinfa de *P. hawaiiensis*. Após 96 h de exposição, a hemolinfa foi coletada com um capilar fino inserido no 2° ou 3° segmento do organismo adulto (8 meses) e transferida para um tubo eppendorf com 20 µL de água salina. Adicionou-se 20 µL de agarose *low melting point* (LMP) 1% ao tubo e o conteúdo final foi dividido em duas alíquotas de 20 µL que foram colocadas em uma lâmina preparada com agarose *normal melting point* (NMP) e cobertos por lamínulas. As lâminas foram colocadas em uma geladeira a 4°C por 20 min e, depois, retirou-se as lamínulas e colocou-se as lâminas em cubetas, com a lise final. As cubetas foram colocadas na geladeira por 2 h. Após, as lâminas foram lavadas com água salina gelada, dispostas na cuba de eletroforese e cobertas pela solução de eletroforese, ficando de repouso por 20 min. Depois, iniciou-se a corrida por 24 min nas condições de 20V e 300mA. Lavou-se as lâminas com a neutralização, deixando escorrer por 5 min, repetindo esse processo 2 vezes. Por fim, as lâminas foram cobertas por etanol 100% por 15 min e deixadas à temperatura ambiente para secar. A coloração das lâminas foi feita com a adição de 20µL de brometo

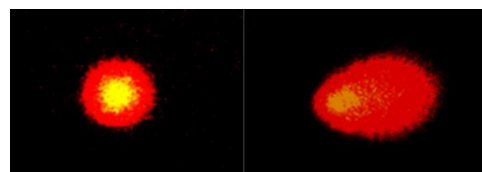


Figura 2. Ensaio cometa com hemócitos de *Parhyale hawaiiensis*. A esquerda, célula sem dano no material genético e, a direita, célula com dano no material genético.

de etídio (4%). A leitura do ensaio foi feita em microscópio de fluorescência, contando-se 100 células por gel e medindo-se a intensidade e comprimento da cauda, em porcentagem, pelo software Comet Score 2.0 (Figura 2). Para análise estatística, foi utilizado o software RStudio. Os dados foram avaliados quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e apresentaram uma distribuição não normal. Portanto, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para avaliar diferenças entre as condições testadas ( $p < 0,05$ ). Para validação do ensaio cometa, realizou-se a viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de trypan. Para todas as condições testadas, a viabilidade celular foi acima de 80%.

### 3. Teste Micronúcleo

O ensaio foi feito de acordo com Botelho *et al.* (2022), sendo utilizado, como controle positivo, zinco 2,5 mg/L e, como controle negativo, DMSO 0,01%. Os micronúcleos foram observados nos hemócitos de *P. hawaiiensis* (Figura 3). Os organismos adultos foram expostos por 96 h aos compostos. A hemolinfa foi retirada e transferida para um eppendorf contendo 20  $\mu$ L de água salina. Essa suspensão foi transferida para uma lâmina que foi colocada em câmara úmida por 15 min. As lâminas foram lavadas com água salina, cobertas com formaldeído 1:10 e colocadas em câmara úmida por 15 min. Colocou-se as lâminas para secar em temperatura ambiente. Após estarem secas, as lâminas foram imersas com metanol por 10 min e, então, foram coradas com Giemsa 10% por 20 min. Por fim, as lâminas foram lavadas com água corrente e água deionizada e foram postas para secar. A leitura das lâminas foi feita em microscópio no aumento de 1000x, contando-se 500 células em cada lâmina. A análise estatística foi feita com o software RStudio, avaliando, primeiramente, os dados quanto a sua normalidade e homoscedasticidade (Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente). Como os dados não possuem uma distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney para comparar as diferenças entre as condições testadas ( $p < 0,05$ ).

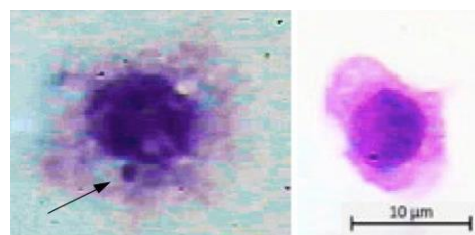


Figura 3. Teste micronúcleo em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis*. A esquerda, célula com micronúcleo indicado pela seta preta e, a direita, célula sem micronúcleo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No ensaio cometa, não houve diferenças significativas entre o emodin e seus derivados (Em-DR1 e Em-DR2) em relação ao controle negativo (Figura 4). Esse resultado divergiu de Go *et al.* (2007), que observaram que o emodin foi genotóxico para células de ratos expostas *in vitro*, durante 2 h, a concentrações de 7,5 mg/L a 30 mg/L. Entretanto, esses resultados são coerentes com os resultados obtidos por Muller *et al.* (1996), que observaram que o emodin, na concentração de 15 mg/L, não apresentou genotoxicidade a células de rato expostas *in vitro* por 5 h.

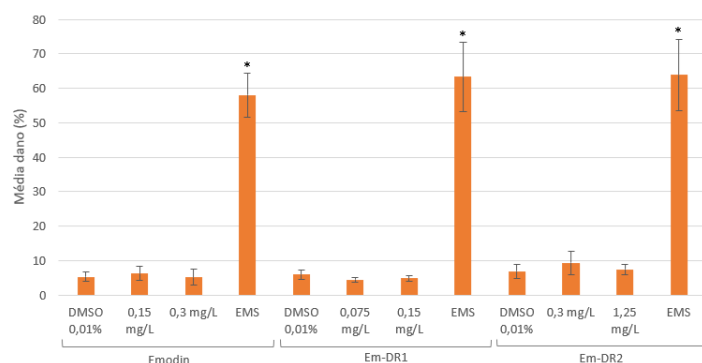


Figura 4. Média do dano (% de DNA na cauda) nas células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* após exposição *in vivo* por 96 horas ao emodin e suas derivações. A barra de erro representa o desvio padrão da média. (\*):  $p < 0,05$ .

Por conta do resultado obtido com o ensaio cometa, decidiu-se aumentar as concentrações do emodin. Para isso, inicialmente, foi necessário verificar qual a concentração máxima de DMSO que poderia ser empregada no ensaio cometa utilizando hemolinfa da *P. hawaiiensis*. Os artigos de Go *et al.* (2007) e Muller *et al.* (1996) utilizaram concentrações de DMSO de 1%. Portanto, o ensaio cometa foi realizado com concentrações de 0,1% e 1% de DMSO. O DMSO não causou diferença significativa em relação ao controle negativo (Figura 5). Dessa forma, foi possível aumentar as concentrações do emodin para 3 mg/L e 30 mg/L. Porém, após o primeiro dia de exposição, os organismos de *P. hawaiiensis* não sobreviveram. Com isso, não foi possível verificar a genotoxicidade do emodin em concentrações maiores.

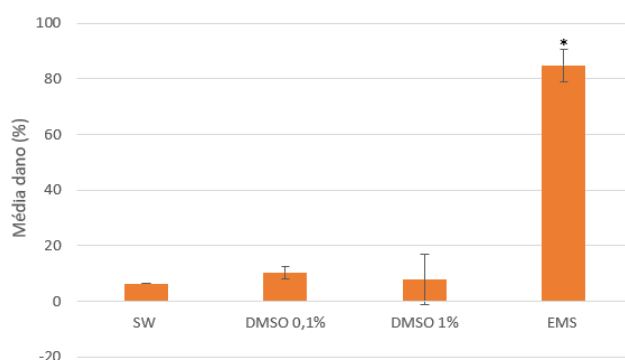


Figura 5. Média do dano (% de DNA na cauda) nas células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* após exposição *in vivo* por 96 horas ao DMSO 0,1% e 1%. (\*):  $p < 0,05$ .

Perante os resultados obtidos e as divergências encontradas na literatura, optou-se por estudar a mutagenicidade *in vivo* com o teste de micronúcleo. O emodin, Em-DR1 e Em-DR2 tiveram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em comparação com o controle negativo (Figura 6). Na literatura, não há dados sobre a mutagenicidade *in vivo* do emodin com organismos aquáticos, porém em células humanas, o emodin aumentou a frequência de micronúcleo em concentrações maiores que 40 mg/L (LI *et al.*, 2010).

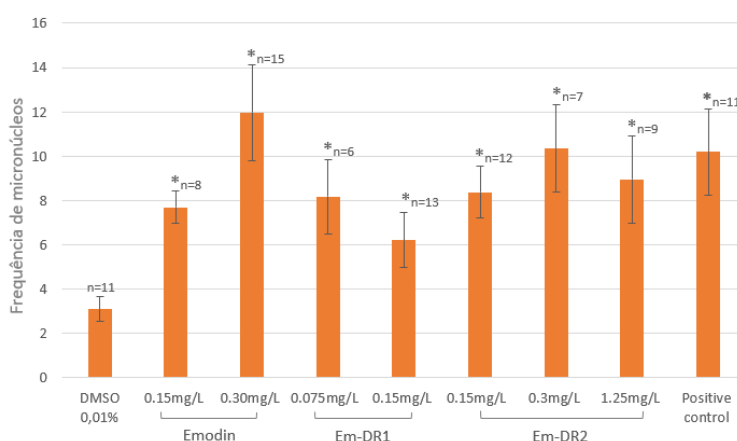


Figura 6. Frequência de micronúcleos (%) em hemócitos de *P. hawaiiensis* para cada exposição. (n) = número de células analisadas em cada condição. A barra de erro representa o desvio padrão. (\*):  $p < 0,05$ .

Além disso, o emodin e seus derivados foram mutagênicos no teste de Salmonella/microsossoma com a linhagem TA 1537 na presença de ativação metabólica (Rampazzo *et al.*, submitted).

## CONCLUSÕES:

Tanto o emodin como seus derivados não causaram dano ao DNA quando medido pelo teste de cometa alcalino. Entretanto, foram capazes aumentar a frequência de micronúcleos nos hemócitos de *P. hawaiiensis* após exposição de organismos adultos por 96 h. Desta forma independentemente da sua eficiência em colorir tecidos em processos *waterless*, os mesmos não se constituem em opções viáveis do ponto vista da saúde humana e ambiental.

---

## BIBLIOGRAFIA

- BOTELHO, M. T. *et al.* Genotoxic effects of silver nanoparticles on a tropical marine amphipod via feeding exposure. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 881, n. June, 2022.
- BROWN, J. P.; BROWN, R. J. Mutagenesis by 9,10-anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 40, n. 3, p. 203–224, 1976.
- DONG, *et al.* Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. **Phytotherapy research**, v. 30, p. 1207–1218, 2016.
- ELABID, A. E. A. *et al.* Improving the low temperature dyeability of polyethylene terephthalate fabric with dispersive dyes by atmospheric pressure plasma discharge. **Applied Surface Science**, v. 375, p. 26–34, 2016.
- GO, S.-Y. *et al.* Genetic toxicity test of emodin by ames, micronucleus, comet assays and microarray analysis showing differential result. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 192–198, 2007.
- HE, Q. *et al.* Toxicity induced by emodin on zebrafish embryos. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 149–154, 2012.
- LACAZE, E. *et al.* Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 700, n. 1–2, p. 32–38, 19 jul. 2010.
- LI, Yan *et al.* Emodin triggers dna double-strand breaks by stabilizing topoisomerase ii-dna cleavage complexes and by inhibiting atp hydrolysis of topoisomerase ii. **Toxicological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 435–443, 20 set. 2010.
- MØLLER, P. *et al.* Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817–3826, 2020.
- MÜLLER, S. O. *et al.* Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: Topoisomerase II mediated? **Mutation Research -Genetic Toxicology**, v. 371, n. 3–4, p. 165–173, 1996.
- NESSLANY, F. *et al.* Aloe-emodin-induced DNA fragmentation in the mouse in vivo comet assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 678, n. 1, p. 13–19, 2009.
- OECD. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. series on testing and assessment No. 23 (2nd edition). **Organisation for Economic Co-operation and Development**, v. 23, n. 23, p. 1–81, 2019.
- RÄISÄNEN, R. Fungal colorants in applications – focus on *Cortinarius* species. **Coloration Technology**, v. 135, n. 1, p. 22–31, 2019.
- RÄISÄNEN, R.; MONTERO, G. A.; FREEMAN, H. S. A fungal-based anthraquinone emodin for polylactide and polyethylene terephthalate in supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) dyeing. **Color Research and Application**, v. 46, n. 3, p. 674–680, 2021.
- RAMPAZZO, G. M. *et al.* Acryloyl esters of emodin for waterless dyeing and toxicological studies, submitted.
- ZHENG, H. *et al.* An industrial scale multiple supercritical carbon dioxide apparatus and its eco-friendly dyeing production. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 16, p. 272–281, 2016.