



XXXI Congresso de Iniciação Científica Unicamp

2023



Caracterização da toxicidade de corantes de alta pureza utilizando embriões de *Danio rerio*

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

Autores:

Jéssica Carolina Silva Oliveira [FT - UNICAMP]

ORIENTADORA: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (ORIENTADOR) [FT - UNICAMP]

CO- ORIENTADORA: Ma. Natália Oliveira de Farias [IB - UNICAMP]

Introdução

Os corantes têm sido amplamente utilizados ao redor do mundo por diversos setores, como por exemplo as indústrias têxteis, farmacêuticas e cosméticas. (LUNA et al., 2014; ZANONI; YAMANAKA, 2016).

No intuito de reunir mais informações sobre os diferentes tipos de corantes existentes, a *Max Weaver Dye Library* (MWDL) se destaca como um repositório na *North Carolina State University* (NCSU) contendo mais de 98.000 amostras de corantes sintéticos que poderão ser explorados nos mais diversos setores, como o de tingimento de tecidos, cosméticos, produtos domésticos, etc. No entanto, pouco se sabe a respeito das propriedades tóxicas desses corantes. Modelos *in silico* tem se mostrado uma ferramenta importante para predição das propriedades físico-químicas e da toxicidade dos corantes, mas ainda faltam dados obtidos de ensaios de toxicidade com corantes especialmente de alta pureza e quimicamente caracterizados para compor os bancos de dados (UMBUZEIRO et al., 2019).

Os corantes podem exercer efeitos prejudiciais em organismos não-alvo, podendo impactar o meio ambiente em decorrência do lançamento de efluentes provenientes dos processos de tingimento em corpos hídricos (UMBUZEIRO et al., 2005). Além disso, diversos corantes causam efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos tanto em humanos quanto em outras espécies de animais (CHUNG et. al., 2016).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo animal que apresenta diversas vantagens que favorecem seu uso em testes ecotoxicológicos, como tamanho pequeno, alta taxa de fecundidade, ciclo de vida curto e fácil cultivo. Já no estágio embrio-larval, esses são transparentes o que facilita a visualização dos órgãos internos permitindo a caracterização dos efeitos tóxicos dos corantes *in vivo*. O peixe-zebra tem genoma sequenciado, o que o torna um ótimo modelo para estudos de biologia molecular (JUNG et al., 2012). Aproximadamente 75% dos genes do peixe-zebra são homólogos aos genes humanos, representando um bom modelo para fins comparativos aos efeitos tóxicos observados em seres humanos (JUNGTANASOMBUT et al., 2014).

Metodologia

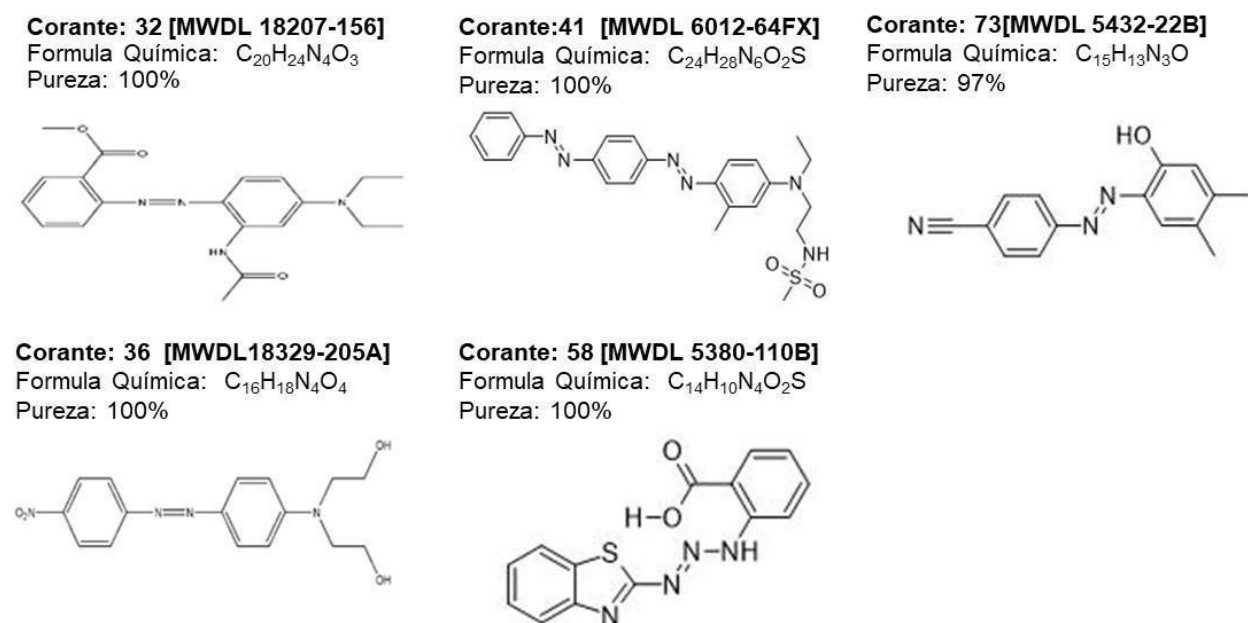
Comitê de ética

Os testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra foram realizados somente após aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) - UNICAMP (protocolo número: 6038-1/2022).

Corantes

Cinco corantes do tipo azo com pureza acima de 97% foram testados, denominados como corantes experimentais 32, 36, 41, 58 e 73. A estrutura molecular, fórmula química, pureza (%) e solubilidade em água (mg/L) dos corantes estão representados na Figura 1.

Figura 1. Estrutura molecular, fórmula química, pureza (%) e solubilidade em água (mg/L) dos corantes experimentais 32, 36, 41, 58 e 73.



Fonte: Autor, (2023).

A estrutura molecular, pureza (%), solubilidade em água (mg/L) e massa exata dos corantes foi confirmada por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e espectrômetro de massas de alta resolução (OLIVEIRA, M. H; 2021).

Preparo das soluções dos corantes

Os ensaios foram realizados seguindo o protocolo da OECD 236 *Fish Embryo Toxicity Test* (Teste FET) (OECD, 2013). Como os corantes possuem baixa solubilidade em água, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado para diluir os corantes. Diluições sucessivas foram realizadas para obter as cinco concentrações finais de cada corante, sendo elas: corante **32**: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 8 mg/L; **36**: 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; e 2,5 mg/L; **41**: 0,09; 0,18; 0,35; 0,7 e 1,4 mg/L; **58**: 0,003; 0,006; 0,0125; 0,025 e 0,05 mg/L; **73**: 0,08; 0,16; 0,31; 0,62 e 1,25 mg/L distribuídas em placas de 24 poços. Também foi utilizado controle solvente com DMSO (não excedendo a concentração de 100 µL/L), um controle positivo com 4 mg/L de 3,4-dichloroanilina, bem como um controle negativo, composto somente por água reconstituída ISO que é formada por água de osmose reversa reconstituída com cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio.

Cultivo do peixe-zebra (*Danio rerio*)

Os peixes adultos são mantidos em aquários com osmose reversa e água de cultivo filtrada com carvão ativado, em uma instalação aquática com fotoperíodo controlado (12:12h, claro: escuro) e parâmetros físico-químicos da água controlados: a temperatura mantida a $26,0 \pm 1$ °C, amônia $< 0,01$ mg/L, condutividade a 750 ± 50 μ S/cm, pH a $7,5 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido igual ou superior a 95% de saturação.

Teste de embriotoxicidade com peixe-zebra (Teste FET)

Os ovos de peixe-zebra utilizados nos experimentos foram coletados imediatamente após o acasalamento, lavados em água reconstituída ISO e verificados sob um estereomicroscópio (Sterioscopic STEMI 2000 C - Zeiss). Os ovos não fertilizados e aqueles com irregularidades no córion ou lesões foram descartados. Os ensaios iniciaram nas primeiras horas após a fertilização e tiveram duração de 168 h em condições estáticas. Parâmetros letais e sub-letais do desenvolvimento embrionário foram avaliados e os embriões foram observados diariamente sob um estereomicroscópio (Sterioscopic STEMI 2000 C - Zeiss).

Antes da eclosão, os seguintes parâmetros foram avaliados: ovo coagulado, formação dos otólitos, atraso geral no desenvolvimento, pigmentação dos olhos e do corpo, formação de somitos, batimentos cardíacos, edemas, descolamento da cauda do saco vitelino, absorção do saco vitelino e eclosão. Após a eclosão, malformação da cauda, insuflação da bexiga natatória e equilíbrio (embriões deitados de lado no fundo do poço da microplaca) também foram avaliados. Os parâmetros físico-químicos (pH e condutividade) do controle solvente, do controle negativo e da concentração mais baixa e mais alta dos corantes foram medidos no início e ao final do teste.

Resultados e Discussão

Não foram observadas alterações nos parâmetros físico-químicos da solução de exposição ao final das 168 h de exposição. Os dados podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Valores obtidos para os parâmetros físico-químicos (pH e condutividade) no teste de embriotoxicidade das soluções de exposição após 168 h.

Compostos	Concentração	pH	pH	Condutividade	Condutividade
	(mg/L)	(Inicial)	(Final)	μ S/cm (Inicial)	μ S/cm (Final)
Controle solvente (0,01% DMSO)	-	7,35	7,38	750	721
Corante 32	0,05	7,68	7,50	757	741
	0,8	7,72	7,47	748	739
Corante 36	0,16	7,68	7,50	730	733
	2,5	7,72	7,67	732	742
Corante 41	0,09	7,68	7,50	730	733
	1,4	7,72	7,47	732	742
Corante 58	3,12	7,68	7,50	753	750
	50	7,72	7,47	730	738
Corante 73	0,08	7,49	7,50	759	747
	1,25	7,38	7,47	737	739

Fonte: Autor, (2023).

Durante o período de 168 h de exposição, não foi constatada precipitação dos corantes experimentais 32, 36, 41 e 58. No entanto, o corante 73 apresentou precipitação ao longo de todos os dias do ensaio à partir da concentração de 1,25 mg/L.

Não houve mortalidade no grupo controle solvente (DMSO 0,01%) ao longo das 168 h de exposição. Não foi possível observar mortalidade significativa para nenhum dos corantes testados, a taxa mais alta de mortalidade foi de apenas 10% para os corantes 32 e 36. Em relação aos efeitos sub-letais, também não foram observadas anormalidades no desenvolvimento embrionário dos organismos expostos aos corantes. Os resultados de mortalidade estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Dados de mortalidade (%) dos embriões de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações dos corantes experimentais 32, 36, 41, 58 e 73.

Corante 32		Corante 36		Corante 41		Corante 58		Corante 73	
Concentração (mg/L)	Mortalidade (%)	Concentração (mg/L)	Mortalidade (%)	Concentração (mg/L)	Mortalidade (%)	Concentração (mg/L)	Mortalidade (%)	Concentração (mg/L)	Mortalidade (%)
DMSO (0,01%)	0	DMSO (0,01%)	0	DMSO (0,01%)	0	DMSO (0,01%)	0	DMSO (0,01%)	0
0,05	5	0,16	0	0,09	0	0,003	0	0,08	0
0,1	5	0,31	5	0,18	0	0,006	0	0,16	0
0,2	5	0,62	10	0,35	0	0,0125	0	0,31	0
0,4	5	1,25	0	0,7	5	0,025	0	0,62	0
0,8	10	2,5	0	1,4	5	0,05	5	1,25	5

Fonte: Autor, (2023).

CONCLUSÕES

Os corantes não foram tóxicos para os embriões de peixe-zebra, nas concentrações testadas, respeitando o limite de 0,01% de DMSO. Os resultados gerados poderão ser usados futuramente para compor conjuntos de dados para o desenvolvimento de modelos de predição mais precisos, pois neste caso a pureza dos corantes ($\geq 97\%$) é essencial para obtenção de dados confiáveis. Novos ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos são necessários para compreender melhor os efeitos tóxicos dos corantes analisados neste estudo.

REFERÊNCIA

de LUNA, L. A.V et al. Aquatic toxicity of dyes before and after photo-Fenton treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 276, p. 332-338, 2014.

JUNGTANASONBUT et al.. . Effects of reactive red 239 on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 48(4), 619–628, 2014.

OECD 236. Fish embryo toxicity test. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, (July), 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>, 2013

OLIVEIRA, M. H. Avaliação da toxicidade aguda de corantes hidrofóbicos usando dosagem passiva.. p. 32. Faculdade de Tecnologia – UNICAMP. Limeira – SP, 2021.

UMBUZEIRO, G. A. et al. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, v. 60, p. 55–64, 2005

UMBUZEIRO, G. A. et al. Purification and characterization of three commercial phenylazoaniline

disperse dyes. *Coloration Technology*, v. 133, p. 513-518, 2017.

UMBUZEIRO, G. A. et al. Towards a reliable prediction of the aquatic toxicity of dyes. *Environmental Sciences Europe*, 31:76, p. 1-11, 2019.

ZANONI, M. V. B & YAMANAKA, H. *Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.