UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação ecogenotoxicológica de corante natural extraído de micro-organismo

Flavia Renata Abe

Ribeirão Preto
2017

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

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Abe, Flavia Renata
Avaliação ecogenotoxicológica de corante natural extraído de micro-organismo. Ribeirão Preto, 2017.
170 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientadora: Oliveira, Danielle Palma de.

1. Corante natural. 2. Corante sintético. 3. Ecotoxicologia aquática. 4. Toxicologia. 5. Hepatócitos humanos. 6. Epiderme humana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flavia Renata Abe

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.

Orientadora: Prof. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Deixo os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram neste trabalho, nas suas mais variadas funções. Esta tese é resultado da confiança e força de cada um de vocês.

À minha orientadora Dra. Danielle Palma de Oliveira, agradeço os conselhos e incentivos, e toda a confiança depositada neste trabalho, que resultou em muito amadurecimento profissional e pessoal. Acima de tudo, agradeço a motivação e amizade durante esta jornada.

Ao Dr. Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares e ao seu grupo de pesquisa, agradeço a oportunidade para realizar o estágio de pesquisa na Universidade de Aveiro, e a confiança em me receber no *Applied Ecology and Ecotoxicology Research Group* do Departamento de Biologia (BioApplEE), enriquecendo deveras o projeto inicial. Agradeço toda a confiança e incentivo depositados em mim, que me amadureceram infinitamente como pesquisadora.

A todos os colegas de laboratório que trabalharam comigo, agradeço a colaboração e experiências compartilhadas, e aos momentos de descontração que tornaram meus dias mais leves, em particular à Ana Luísa P. Silva, Rita Almeida, Otávio P. Rocha, Gabriela Meirelles, Cibele A. Cesila, Murilo Pazin, Lilian C. Pereira, Tamires V. Brigante, Camila A. Mini, Maíra Prado, Raul G. Miranda, Mariana F. F. Bernardes, Maria Júlia Tasso e Bárbara de Oliveira. Um agradecimento especial aos técnicos Klaus A. G. Accoroni e Sônia A. C. Dreossi, do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e ao técnico Abel Ferreira, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pela fundamental e incansável participação em todo o *background* deste trabalho.

Este trabalho também foi possível graças à colaboração de docentes que me apoiaram nos mais diversos contextos. Agradeço a todos pela, conversas e conselhos oferecidos a este trabalho. Um agradecimento ao Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e à sua aluna, Dra. Jacqueline N. Mendonça, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por ceder o corante natural e suas respectivas análises químicas realizadas, e pela paciência em discutir todos os pormenores do corante. À Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira e à Dra. Daniela Morais Leme, pela prestatividade de sempre, apoio e amizade, que indubidavelmente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho quando tudo parecia intragável. A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Rosana Florêncio e Rosemary Ioshimine Gerolineto, por toda a atenção e apoio recebidos, e pela boa disposição de sempre.

Um agradecimento especial ao Dr. Eduardo Angelino Savazzi, gerente técnico da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) de Ribeirão Preto, pela confiança em me receber no laboratório, e à equipe Maristela R. L. Ferraz, André F. D. Micas e Fátima A. Bogas, por todo o aprimoramento adquirido. À técnica Vani Maria Alves, do Laboratório de Histotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela prestatividade e contribuição recebida neste trabalho e pelas palavras e conselhos que guardo para a vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro no país (processo n.º 2013/14397-0; 2016/03281-9) e no exterior (processo n.º 2014/27009-1).

À família e amigos
que suportaram a minha ausência,
vocês são a minha inspiração.

"Era uma pessoa igual a cem mil outras pessoas.
Mas, eu fiz dela um amigo,
Agora ela é única no mundo"

Le Petit Prince

Ao melhor companheiro,
que mais merece minha admiração,
e impulsionou a conclusão desta tese.
A você devo quase tudo e mais um pouco.

"L'essentiel est invisible pour les yeux"

Antoine de Saint-Exupéry

"Todas as substâncias são venenosas.
Não há nenhuma que não seja.
A dose certa diferencia um veneno de um remédio"

Philippus Paracelsus

RESUMO

ABE, F. R. **Avaliação ecogenotoxicológica de corante natural extraído de micro-organismo**. 2017. 170f. 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.

ABSTRACT

ABE, F. R. **Ecogenotoxicological evaluation of natural dye extracted from microorganism**. 2017. 170f. Tesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Synthetic dyes are widely used by textiles, cosmetic, food and pharmaceutical industries. However, several compounds have high inherent toxicity, and many are precursors of mutagenic and/or carcinogenic intermediates produced during metabolism. Thereby, the use of natural dyes became an alternative to the synthetic ones, in search of safe compounds for human and environmentl health. In this context, we aimed to investigate the toxicological and ecotoxicological potential of the natural dye erythrostominone (Ery), a naphthoquinone compound extracted from microorganism, using alternative methods to animal experimentation. Additionally, it was assessed the ecotoxicity of the Basic Red 51 (BR51), an azo synthetic dye used bu cosmetic and textile industries, and the Ery degraded (EryD) after exposure to light, aiming an easy alternative to industrial effluent treatments containing the dye. Ecotoxicological assessment was performed at different trophic levels: in the microcrutaceans *Daphnia magna* and in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. Toxicological assessment of Ery was also performed in human hepatocellular line (HepG2) as target organ of xenobiotic metabolism, and in equivalent human epidermis (EHE), a 3D model constructed with immortalized human keratinocytes (HaCaT), since dermal contact is expected due to potential use as cosmetic dye. Our results showed that Ery and BR51 are toxic for *D. magna* and zebrafish. BR51 induced alterations in immobility, reproduction, oxygen uptake and behavior of *D. magna* at concentrations up to 200-fold higher than those of Ery able to impair immobility, reproduction and behavior. However, for zebrafish embryos and larvae, both dyes showed toxic effects at close concentrations, with changes in embryo development and behavior, induction of pro-oxidant effects and changes in the energy balance of organisms. Interestingly, EryD showed no toxic effect on aquatic organisms, demonstrating that light was able to reduce and/or inactivate the toxicity of the initial chemical structure. For human cell lines, Ery showed to be cytotoxic to HepG2, with apoptosis being the main source of cell death. Ery also induced a delay in HepG2 cell cycle, particularly in the mitosis phase (G2/M), decreasing cell proliferation. On the other hand, Ery presented no genotoxic and mutagenic potential for HepG2 and did not induce cytotoxicity and genotoxicity after short-term exposure to EHE. In conclusion, Ery and BR51 are classified as toxic and very toxic to the aquatic environment, respectively. Ery also induces pro-apoptotic effects, which may be linked to the chemical structure of quinones. Therefore, Ery presents potential industrial applicability as an eco-friendly dye, highlighting the easy and rapid photodegradation, and the non-genotoxic and mutagenic effects for human cells. Further assessment of apoptosis mechanisms should be performed to ensure safety to human health.

Keywords: Erythrostominone, Basic Red 51, photodegradation, zebrafish, daphnidae, human hepatocytes, human epidermis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do corante sintético Basic Red 51 (A) e do corante natural eritrostominona (B). 6

Figura 2. Esquema da quebra da acetilcolina em acetato e colina pela atividade da enzima acetilcolinesterase. 13

Figura 3. Esquema de estresse oxidativo induzido por xenobiótico. CYP450: citocromo P450, GST: glutationa S-transferase, GSH: glutationa reduzida, GSSG: glutationa oxidada, SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, OH: radical hidroxila. 15

Figura 4. Exemplo de reações em cadeia da peroxidação lipídica induzida por radicais livres ou espéries reativas de oxigênio (EROs). LH: cadeia de lipídios poli-insaturados; $R^{\bullet}$: radical livre reativo; $OH^{\bullet}$: espécie reativa de oxigênio; $L^{\bullet}$: radical lipídico centrado no carbono; $LOO^{\bullet}$: radical peroxila; LOOH: hidroperóxido de lipídio..... 15

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. 16

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. 18

Figura 7. Esquema de lesões de quebras de fita simples, quebra de fita dupla e ligações cruzadas no DNA. 18

Figura 8. Esquema da metabolização e biotransformação de xenobióticos em hepatócitos humanos. ... 23

Figura 9. Estrutura estratificada da epiderme. Criosecção de epiderme humana reconstruída (8 µm, coloração H.E.). Esquema das correspondentes camadas da epiderme. 24

Figura 10. Esquema da redução do MTT a sal de formazan pelas enzimas desidrogenases mitocondriais. 25

Figura 11. Esquema da coloração de células em apoptose pela anexina V. 26

Figura 12. Esquema de formação de micronúcleo (MN) por atraso do cromossomo acêntrico inteiro e por fragmentos de cromátides acêntricas não incorporados ao núcleo principal, e ponte nucleoplasmática em células binucleadas submetidas a divisão celular na presença do bloqueador de citocinese citocalasina B..... 28

Figura 13. Cromatogramas em diferentes tempos adquiridos em 315 nm para eritrostominona (A) e em 295 nm para Basic Red 51 (B). Análises realizadas pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes da FFCLRP, USP..... 34

Figura 14. Espectrograma UV/vis (A), espectrograma MS (B) e espectrograma MSMS (C) do eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradado (EryD), e fragmentação do Ery (D). Análises realizadas pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes da FFCLRP, USP. 34

Figura 15. Biotério de zebrafish. (A) Sistema de manutenção ZebTec (Tecniplast, Itália). (B) Aquário com divisória utilizado para a reprodução de zebrafish. (C) Ovos de zebrafish em período de clivagem com 4, 8, 16, 32 e 64 células, respectivamente, da esquerda para a direita. 35

Figura 16. Exposição de embriões de zebrafish ao corante eritrostominona (Ery) em placas para cultura celular de 24 poços. Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle negativo; 1,88; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg/L de Ery. 36

Figura 17. Exposição de embriões de zebrafish ao corante Basic Red 51 (BR51) em placas para cultura celular de 96 poços pouco antes do rastreamento. Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle negativo; 1,88; 3,75; 7,5 e 15 mg/L de BR51. 37

Figura 18. Embriotoxicidade em zebrafish com 96 hpf. Embriões expostos ao (A) controle negativo; (B) 7,5 mg/L de Basic Red 51 com saco vitelínico anormal; (C) 7,5 mg/L de eritrostominona com saco vitelínico anormal e edema de pericárdio; (D) 30 mg/L de eritrostominona degradado; sv: saco vitelínico, cabeça da seta: edema de pericardio (amplificação 30x). 39

Figura 19. Malformações induzidas em zebrafish com 96 hpf. Valores apresentados em porcentagem de efeitos adversos (edemas de saco vitelínico e pericárdio, e saco vitelínico anormal) induzidos pelo (A) Basic Red 51 (BR51) e (B) eritrostominona (Ery) em embriões vivos, excluindo as concentrações com elevada mortalidade. 41

Figura 20. Atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas a 15 mg/L dos corantes eritrostominona (Ery), seu fotodegradado (EryD) e Basic Red 51 (BR51). Valores representados por média de larvas (n=20) por min. Cada ciclo de 10 min está representado por barras pretas (ciclo no escuro) e brancas (ciclo no claro). 42

Figura 21. Atividade locomotora de zebrafish com 144 hpf expostos aos corantes. Ciclos de 10 min no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). DTN: distância total de natação, TTN: tempo total de natação, Vel: velocidade. Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. 43

Figura 22. Exposição de embriões de zebrafish ao corante Basic Red 51 (BR51), durante 96 hpf. Da direita para esquerda: controle negativo; 1,88; 3,75; 7,5 e 15 mg/L de BR51. 52

Figura 23. Níveis da atividade da (A) GST e (B) CAT em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. 56

Figura 24. Níveis da glutationa total (GT) em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. 57

Figura 25. Níveis da peroxidação lipídica (LPO) em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. 58

Figura 26. Comparação das médias de intensidade de DNA na cauda (*Tail intensity*) pelo ensaio do cometa realizado em embriões de zebra com 96 hpf expostos ao (A) Basic Red 51 (BR51); (B) eritrostominona (Ery) e (C) eritrostominona degradado (EryD). 59

Figura 27. Níveis da (A) energia total consumida (Ec) e (B) alocação de energia celular (AEC) em embriões de zebrafish expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD) durante 96 hpf. Valores representados por média ± erro padrão (n=7 grupos com 19 embriões cada). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. 73

Figura 28. Níveis da atividade da LDH em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20). 73

Figura 29. Níveis da atividade da AChE em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. 74

Figura 30. Atividade locomotora de larvas de zebrafish com 144 hpf expostas aos corantes (A) Basic Red 51 (BR51), (B) eritrostominona (Ery) e (C) seu fotodegradado (EryD). Valores representados por média de larvas (n=20) por minuto. Cada ciclo de 10 min está representado por barras pretas (ciclo no escuro) e brancas (ciclo no claro). 75

Figura 31. Exposição de *D. magna* em placas para cultura celular de 6 poços, durante 48 h no escuro. Da esquerda para direita: Basic Red 51, eritrostominona fotodegradado, eritrostominona..... 84

Figura 32. Exposição de *D. magna* aos corantes em recipientes de 50 mL, durante 21 dias. A: Basic Red 51, B: eritrostominona, C: eritrostominona fotodegradado. 85

Figura 33. Exposição de *D. magna* aos corantes em seringas gastight (Hamilton, USA), durante 24 h. (A) Basic Red 51, (B) eritrostominona, (C) eritrostominona fotodegradado. 86

Figura 34. Imagens do rastreamento de *D. magna* em placas para cultivo celular de 24 poços. Ciclos no (A) escuro e (B) no claro. Linhas representam o caminho percorrido pelas larvas durante um período de integração (60 s), linhas vermelhas, movimentos acima de 1 mm, linhas verdes, movimentos entre 0,5 e 1 mm. 87

Figura 35. Exposição de *D. similis* ao corante eritrostominona (Ery) em recipientes de 10 mL, durante 48 h. Da esquerda para direita: branco, controle negativo, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L de Ery. .. 89

Figura 36. Efeitos do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) and eritrostominona degradada (EryD) para *D. magna*. A: Imobilidade dos neonatos. B: número total de neonatos por fêmea adulta. C: idade das fêmeas na primeira reprodução. D: comprimento corporal das fêmeas adultas com 21 dias. E: taxa intrínseca de crescimento populacional (*r*). F: consumo de oxigênio. 90

Figura 37. Comportamento de *D. magna* após 24 h de exposição ao eritrostominona (Ery) (A-D) e ao Basic Red 51 (BR51) (E-H). Valores apresentados em média de neonatos (n=20) por minuto. 94

Figura 38. Mitocôndrias isoladas de fígado de rato incubadas com o corante Ery. Da esquerda para direita: controle negativo; 0,1; 1; 10; 25 e 50 mg/L. 102

Figura 39. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery). Da esquerda para direita: controle positivo, 696, 35, 261, 174, 87, 435, 348 mg/L de Ery, e controle negativo. 104

Figura 40. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery) em placas para cultura celular de 6 poços, durante 24 h. Da esquerda para direita: controle negativo, 87, 174, 261, 348 e 522 mg/L de Ery. 106

Figura 41. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery). Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle positivo, controle negativo, 35, 87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L de Ery. 107

Figura 42. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery). Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle negativo, 35, 87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L de Ery e controles positivos. 109

Figura 43. Inserto com epiderme sobre *cell strainer* (100 µm) em placa de 6 poços *deep well* (Corning® BioCoat). 110

Figura 44. Estrutura estratificada da epiderme humana equivalente (EHE) construída com queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) sobre membrana do inserto. Análise histológica em cortes de parafina (8 µm, coloração H.E.). Aumento de 40×. 110

Figura 45. Tratamento tópico das epidermes humanas equivalentes. A: controle negativo com 26 µL/cm^2 de tãmpão PBS. B: tratamento com 26 µg/cm^2 de eritrostominona. C: modelos expostos aos tratamentos. 111

Figura 46. Lavagem das epidermes humanas equivalentes após 15 min de exposição aos tratamentos. A e B: modelos lavados com tampão PBS e acetona. C: Secagem com swab. 111

Figura 47. Epidermes humanas equivalentes após a incubação ao MTT. A lavagem insuficiente dos modelos após a exposição ao eritrostominona, seguida da incubação por 42 h e incubação com o MTT, causou a exposição prolongada ao corante e inviabilizou o teste. A: controle negativo com tampão PBS. B: exposição ao Ery (20 lavagens com tampão PBS). C: exposição ao Ery (4 lavagens com acetona + 20 lavagens com tampão PBS)..... 113

Figura 48. Exposições das epidermes humanas equivalentes aos tratamentos. A: branco. B: controle negativo com 16 µL/cm^2 de acetona. C: controle positivo com 5 µg/cm^2 metil metanosulfonado. D: 1 mg/mL de eritrostominona. E: 10 mg/mL de eritrostominona. F: 100 mg/mL de eritrostominona. 114

Figura 49. Efeito de proteção ao estresse oxidativo do eritrostominona (Ery) em mitocôndrias expostas a 300 µmol/L de t-butil-hidroperóxido (t-BOOH). O t-BOOH foi adicionado em todos os tratamentos, exceto no branco (0), para avaliar a capacidade de proteção do eritrostominona. Tratamentos das mitocôndrias com a adição do Ery (mg/L). UFA: unidades arbitrárias de fluorescência. 115

Figura 50. Teste de MTT. A,C: Extração de sais de formazan reduzidos por HepG2 e EHE, respectivamente, expostas ao eritrostominona (Ery). B,D: Viabilidade celular de HepG2 e EHE, respectivamente, expostas ao Ery. B: Valores brutos. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. D: Valores representados em porcentagem das médias ± desvio padrão. CNE: controle de cor não específica sem adição de MTT; CP: controle positivo. 117

Figura 51. Comparação de células HepG2 expostas ao eritrostominona em (A) necrose, (B) apoptose, (C) viáveis e em (D) necrose e apoptose, pelo teste de anexina V/PI. Valores representados em porcentagem das médias ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. 118

Figura 52. Comparação das médias de células HepG2 expostas ao eritrostominona (Ery) nas fases do ciclo celular G1, S e G2/M pelo teste de ciclo celular.Valores representados em porcentagem ± erro padrão. 118

Figura 53. Comparação das médias de intensidade de DNA na cauda (*Tail intensity*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 (A) e epiderme humana equivalente (B) expostas ao eritrostominona (Ery). 119

Figura 54. Migração do DNA no ensaio do cometa. Quantificação do DNA na cabeça e cauda dos núcleos em células HepG2 (A-C) e epidermes humanas equivalentes (D-F). A,D: controles negativos em DMSO (1% em meio de cultivo) e acetona, respectivamente. B,E: modelos expostos a 522 mg/L e 10 mg/mL de eritrostominona, respectivamente. C,F: controles positivos em metil metanosulfonado a 20 µM e 5 µg/cm^2, respectivamente. Quantificação realizada pelo software Comet Assay IV. Aumento 40 ×. Fonte: próprio autor. 119

Figura 55. Células HepG2 coradas com laranja de acridina. A: controle negativo, B: 435 mg/L de eritrostominona, C-D: controle positivo. Setas: micronúcleo. Aumento 40 ×. Fonte: próprio autor. 120

Figura 56. Resumo dos efeitos adversos induzidos pelo eritrostominona (Ery) e Basic Red 51 (BR51) nos parâmetros avaliados em *Daphnia magna* (vermelho) e nos estágios iniciais de zebrafish (azul). Valores da linha representam concentrações dos corantes (mg/L). 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da CEO e CENO, CL_{50} e CE_{50} (intervalos de confiança: limite inferior – LI, limite superior – LS) (mg/L) do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para embriões de zebrafish, e classificação para o perigo aquático agudo (GHS, 2009). 40

Tabela 2. Valores da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para o FET em zebrafish. 40

Tabela 3. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para o comportamento de zebrafish com 144 hpf. 42

Tabela 4. Valores das CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) (mg/L) para zebrafish com 96 hpf. 57

Tabela 5. Valores das CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) (mg/L) para o balanço energético e biomarcadores LDH e AChE de zebrafish com 96 hpf. 72

Tabela 6. Efeitos do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) sobre a energia disponível (Ed) de embriões de zebrafish com 96 hpf. Valores representados por média ± erro padrão (n=7 grupos com 19 embriões cada). 72

Tabela 7. Valores das CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) (mg/L) para o comportamento de zebrafish com 144 hpf. 75

Tabela 8. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para a imobilidade, ciclo de vida, e consumo de oxigênio de *D. magna*. 91

Tabela 9. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para o comportamento de *D. magna*. 93

Tabela 10. Soluções para cultivo (v/v) e manutenção das culturas celulares humanas. 103

Tabela 11. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) para a linhagem celular HepG2. 116

Tabela 12. Comparação das médias (± erro padrão) da frequência de micronúcleo (MN) em mil células binucleadas (BN) (f_{MN}), frequência de células BN com MN (f_{BN-BN}) em mil células, e Índice de Divisão Nuclear (IDN) de células HepG2 expostas ao eritrostominona (Ery). 120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG. 8-hidroxi-2-deoxiguanosina
AChE. Acetilcolinesterase
AEC. Alocação de energia celular
ANOVA. *Analysis of variance*
ASTM. *American Society for Testing and Materials*
ATCC. *American Type Culture Collection*
BCRJ. Banco de Células do Rio de Janeiro
BHT. Di-terc-butil metil fenol
BN. Binucleada
BR51. Basic Red 51
CAT. Catalase
CCCP. Cianeto de carbonila clorofenilhidrazona
CCMA. Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental
CDNB. 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CE_{50}. Concentração efetiva média
CENO. Concentração de efeito não-observado
CEO. Concentração de efeito observado
CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA. Comissão de Ética no Uso de Animais
CL_{50}. Concentração letal média
CNE. Controle de cor não específica
CYP450. Citocromo P450
DCA. 3,4-dicloroanilina
DCF. 2,7-diclorofluoresceína
DCF-H. 2,7-diclorofluoresceína reduzida
DMEM. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO. Dimetil sulfóxido
DNA. Ácido desoxirribonucleico
DTN. Distância total de natação
DTNB. 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EC. *European Community*
EDTA. Ácido etilenodiamino tetra - acético
EGF. Fator de crescimento epidermal humano
EGTA. Ácido tetracético etilenoglicol
EROs. Espécies reativas de oxigênio
EHE. Epiderme humana equivalente
Ec. Energia consumida
Ed. Energia disponível
Ery. Eritrostominona
EryD. Eritrostominona degradado
ETS. *Electron Transport System*
FCFRP. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FET. *Fish embryo toxicity test*
FCFRP. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FFCLRP. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
F_{MN}. Frequência de micronúcleo
$F_{BN\text{-}MN}$. Frequência de binucleada com micronúcleo
FMRP. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GHS. *Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals*
GPx. Glutationa peroxidase
GSH. Glutationa reduzida
GSSG. Glutationa oxidada
GST. Glutationa S-transferase
GT. Glutationa total
H_2DCF-DA. 2',7'-diacetato de diclorodiidrofluoresceína
HEPES. N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
Hpf. Horas pós-fertilização
IDN. Índice de divisão nuclear
INT. Cloreto de iodonitrotetrazólio
LDH. Lactato desidrogenase
LI. Limite inferior
LMP. *Low Melting Point*
LPO. Peroxidação lipídica
LS. Limite superior
MMS. Metil metanosulfonado
MN. Micronúcleo
MS. Meio de água reconstituída
MTT. Brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH. Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida
NAD(P)H. Nucleotídeo de piridina reduzida
OECD. *Organisation for Economic Cooperation and Development*
PBS. Tampão salino fosfato
PI. Iodeto de propídeo
r. Taxa intrínseca de crescimento populacional
Rpm. Rotações por minuto
SBF. Soro bovino fetal
SOD. Superóxido dismutase
TBA. Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS. *Thiobarbituric acid reactive substances*
T-BOOH. t-butil-hidroperóxido
TCA. Ácido tricloroacético
TGF-α. Fator de crescimento transformante
Tris-HCl. Tris – hidrocloreto
TTN. Tempo total de natação
USP. Universidade de São Paulo
Vel. Velocidade

LISTA DE REAGENTES

1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), Sigma-Alcrich, EUA.
2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT)
2',7'-diacetato de diclorodiidrofluoresceína (H2DCF-DA), Sigma-Aldrich, EUA.
21-hemisuccinato de hidrocortisona, Sigma-Aldrich, EUA.
3,4-dicloroanilina (DCA), Sigma-Aldrich, EUA.
5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTBN), Sigma-Alcrich, EUA.
Acetiltiocolina, Sigma-Aldrich, EUA.
Acetona P.A., Dinâmica, Brasil.
Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), Merk, Alemanha.
Ácido acético, Synth, Brasil.
Ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), Sigma-Aldrich, EUA.
Ácido clorídrico (HCl), Sigma-Aldrich, EUA.
Ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), Merk, Alemanha.
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Sigma-Aldrich, EUA.
Ácido sulfúrico, Merk, Alemanha.
Ácido tricloroacético (TCA), Merk, Alemanha.
Agarose de baixo ponto de fusão (*UltraPure™ Low Melting Point*, LMP), Invitrogen, EUA.
Agarose normal (*UltraPure™ Agarose*), Invitrogen, EUA.
Albumina de soro bovino (BSA), Sigma-Aldrich, EUA.
Anexina V, BD Bioscience, EUA.
Antibióticos penicilina e estreptomicina, Sigma-Aldrich, EUA.
Apo-transferrina humana, Sigma-Aldrich, EUA.
Azul de Tripano, Sigma-Aldrich, EUA.
Bicarbonato de sódio, Merk, Alemanha.
Brometo de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), Sigma-Aldrich, EUA.
Brometo de etídio, Invitrogen, EUA.
Carbonoil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP), Sigma-Aldrich, EUA.
Cisplatina, Tecnoplatin cisplatina, Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil.
Citocalasina B, Sigma-Aldrich, EUA.
Cloreto de potássio, Synth, Brasil.
Cloreto de sódio, Synth, Brasil.
Colágeno humano Tipo IV, Sigma-Aldrich, EUA.
Dimetil sulfoxido (DMSO), Sigma-Aldrich, EUA.
Dodecil sulfato de sódio (SDS), Synth, Brasil.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sem vermelho de fenol, Sigma-Aldrich, EUA.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco®, EUA.
Etanol P.A., Dinâmica, Brasil.
Fator de crescimento epidermal humano (EGF), Sigma-Aldrich, EUA.
Formaldeído P.A., Dinâmica, Brasil.
Fosfato dibásico de sódio anidro, Synth, Brasil.
Fosfato monobásico de potássio, Synth, Brasil.
Glucose, Sigma-Aldrich, EUA.
Glutationa reduzida (GSH), Sigma-Aldrich, EUA.
HAM, Gibco®, EUA.
Hidróxido de sódio, Synth, Brasil.
Insulina humana, Sigma-Aldrich, EUA.
Iodeto de propídio (PI), Sigma-Aldrich, EUA.
Laranja de acridina, Invitrogen, EUA.
Metanol, Synth, Brasil.
Metil metanosulfonado (MMS), Sigma-Aldrich, EUA.
Peróxido de hidrogênio, Vetec Química Fina Ltda, Brasil.
Piruvato, Sigma-Aldrich, EUA.
Polivinilpirrolidona, Sigma-Aldrich, EUA.
Reagente de Bradford, Bio-Rad, EUA.
RNase, Sigma-Aldrich, EUA.
Rotenona, Sigma-Aldrich, EUA.
Sacarose, Synth, Brasil.
Soro bovino fetal (SBF), Gibco®, EUA.
Sulfato de magnésio, Synth, Brasil.
t-butil-hidroperóxido (t-BOOH), Sigma-Aldrich, EUA.
TGF-α recombinante humano, Gibco®, EUA.
Toxina colérica, Sigma-Aldrich, EUA.
Tripalmitina, Sigma-Aldrich, EUA.
Tripsina-EDTA 10x, Sigma-Aldrich, EUA.
Triton X-100, Merk, Alemanha.
Trizma® base, Sigma-Aldrich, EUA.
β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzida (NADPH), Sigma-Alcrich, EUA.
β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), Sigma-Aldrich, EUA.
γ-globulina bovina, Sigma-Alcrich, EUA.

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas viii
Lista de abreviaturas e siglas ix
Lista de reagentes x
Sumário xi
CONTEXTO E ESTRUTURA DA TESE 1
Capítulo 1. Introdução geral e objetivos 4
1.1 Corantes sintéticos e naturais 5
1.2 Avaliação ecotoxicológica para organismos aquáticos 8
1.2.1 Zebrafish (*Danio rerio*) 9
1.2.1.1 Teste de embriotoxicidade (FET) 10
1.2.1.2 Comportamento 11
1.2.1.3 Biomarcadores bioquímicos 12
1.2.1.3.1 Biomarcador colinérgico 13
1.2.1.3.2 Biomarcadores de detoxificação e estresse oxidativo 14
1.2.1.3.3 Biomarcador de balanço energético 16
1.2.1.4 Genotoxicidade 17
1.2.2 *Daphnia magna* e *Daphnia similis* 19
1.2.2.1 Análises do ciclo de vida completo 20
1.2.2.2 Biomarcadores de custo metabólico e comportamento 21
1.3 Avaliação da toxicidade para culturas celulares humanas 22
1.3.1 Hepatócitos humanos 23
1.3.2 Equivalentes de epiderme humana 24
1.3.3 Citotoxicidade celular 25
1.3.4 Genotoxicidade e mutagenicidade 27
1.4 Justificativa 29
1.5 Objetivos 29
Capítulo 2. Zebrafish: desenvolvimento e comportamento 30
2.1 Resumo 31
2.2 Abstract 32

2.3 Introdução 32
2.4 Materiais e Métodos 33
2.4.1 Corantes em estudo 33
2.4.2 Fotodegradação dos corantes 33
2.4.3 Manutenção de zebrafish e obtenção dos ovos 35
2.4.4 Teste de embriotoxicidade em peixes (FET) 36
2.4.5 Ensaio de comportamento 37
2.4.6 Análises Estatísticas 38
2.5 Resultados 38
2.5.1 FET 38
2.5.2 Comportamento 41
2.6 Discussão 43
2.7 Conclusão 46
ANEXO 1 47
Capítulo 3. Zebrafish: detoxificação e estresse oxidativo 48
3.1 Resumo 49
3.2 Abstract 50
3.3 Introdução 50
3.4 Materiais e Métodos 51
3.4.1 Corantes em estudo 51
3.4.2 Manutenção de zebrafish e obtenção dos ovos 51
3.4.3 Biomarcadores bioquímicos 52
3.4.3.1 Glutationa-S-transferase (GST - EC 2.5.1.18) 53
3.4.3.2 Catalase (CAT - EC 1.11.1.6) 53
3.4.3.3 Glutationa total (GT) 53
3.4.3.4 Peroxidação lipídica (LPO) 54
3.4.3.5 Quantificação de proteínas 54
3.4.4 Genotoxicidade 54
3.4.5 Análises estatísticas 55
3.5 Resultados 56
3.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxicação 56
3.5.2 Níveis de antioxidante não-enzimático 57
3.5.3 Peroxidação lipídica (LPO) 58
3.5.4 Genotoxicidade 58
3.6 Discussão 59

3.7 Conclusões 61

ANEXO 1 62

Capítulo 4. Zebrafish: neurotoxicidade e alocação de energia 63

4.1 Resumo 64

4.2 Abstract 65

4.3 Introdução 65

4.4 Materiais e Métodos 66

4.4.1 Corantes em estudo 66

4.4.2 Manutenção de zebrafish e obtenção dos ovos 66

4.4.3 Biomarcadores Bioquímicos 67

4.4.3.1 Energia disponível (Ed) 68

4.4.3.2 Energia consumida (Ec) 68

4.4.3.3 Alocação de energia celular (AEC) 69

4.4.3.4 Lactato desidrogenase (LDH - EC 1.1.1.27) 69

4.4.3.5 Acetilcolinesterase (AChE - EC 3.1.1.7) 69

4.4.3.6 Quantificação de proteínas 70

4.4.4 Ensaio de comportamento 70

4.4.5 Análises Estatísticas 71

4.5 Resultados 71

4.5.1 Energia disponível, energia consumida, alocação de energia celular 71

4.5.2 Lactato desidrogenase (LDH) 73

4.5.3 Acetilcolinesterase (AChE) 74

4.5.4 Atividade locomotora 74

4.6 Discussão 76

4.7 Conclusão 78

ANEXO 1 79

Capítulo 5. Daphnia magna: ciclo de vida, comportamento e consumo de oxigênio 80

5.1 Resumo 81

5.2 Abstract 81

5.3 Introdução 82

5.4 Materiais e Métodos 82

5.4.1 Corantes em estudo 82

5.4.2 Manutenção de *Daphnia magna* e exposição 83

5.4.3 Teste de toxicidade aguda 83
5.4.4 Teste de ciclo de vida completo 84
5.4.5 Taxa de respiração 85
5.4.6 Ensaio de comportamento 86
5.4.7 Manutenção de *Daphnia similis* e exposição 88
5.4.8 Teste de toxicidade aguda 88
5.4.9 Análises Estatísticas 89

5.5 Resultados 89
5.5.1 Imobilidade 89
5.5.2 Ciclo de vida completo 92
5.5.3 Taxa de respiração 92
5.5.4 Atividade locomotora 93

5.6 Discussão 94

5.7 Conclusão 97

Capítulo 6. Saúde humana: Hepatócitos e epiderme 98

6.1 Resumo 99

6.2 Abstract 99

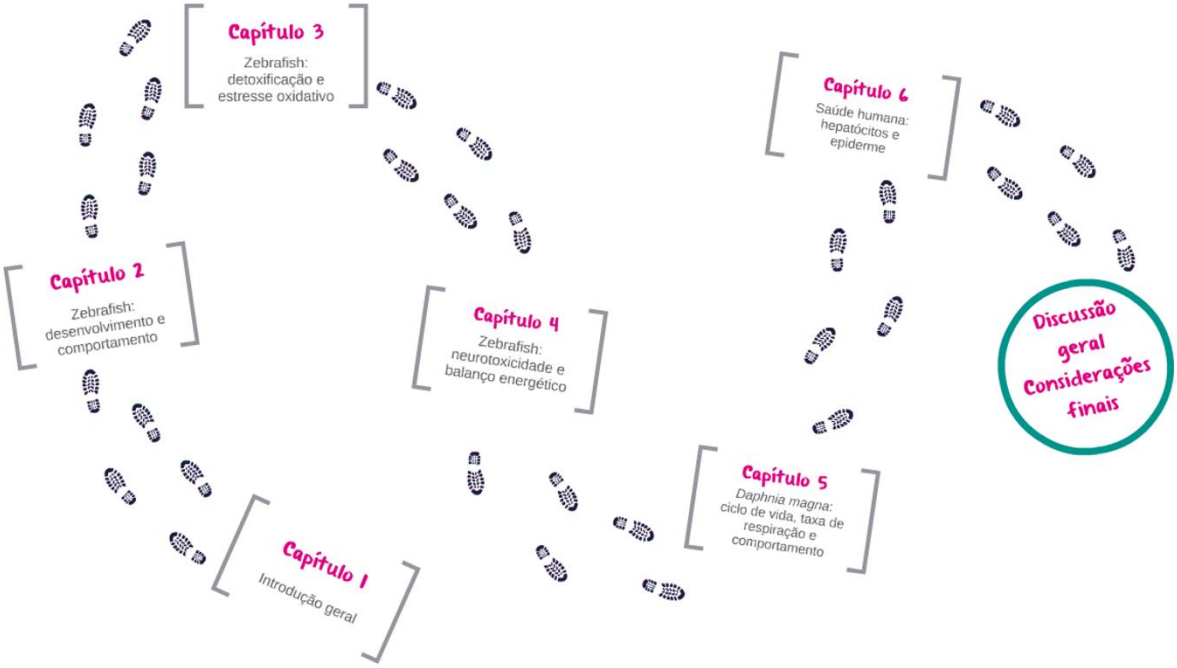
6.3 Introdução 100

6.4 Materiais e Métodos 100
6.4.1 Corante em estudo 100
6.4.2 Proteção à Espécies Reativas de Oxigênio 101
6.4.3 Manutenção das culturas celulares 102
6.4.4 Exposição e ensaios em HepG2 103
6.4.4.1 Citotoxicidade pelo teste de MTT 104
6.4.4.2 Citotoxicidade pelo teste de anexina V / PI 105
6.4.4.3 Teste do ciclo celular 105
6.4.4.4 Genotoxicidade pelo ensaio do cometa 107
6.4.4.5 Mutagenicidade pelo teste de micronúcleo 108
6.4.5 Exposição e ensaios em Epiderme Humana Equivalente (EHE) 109
6.4.5.1 Citotoxicidade pelo teste de MTT 111
6.4.5.2 Genotoxicidade pelo ensaio do cometa 113
6.4.6 Análises Estatísticas 115

6.5 Resultados 115
6.5.1 Proteção ao estresse oxidativo 115
6.5.2 Viabilidade celular 116
6.5.3 Morte celular 117

6.5.4 Ciclo celular 118
6.5.5 Genotoxicidade 119
6.5.6 Mutagenicidade 120
6.6 Discussão 120
6.7 Conclusão 123
Capítulo 7. Discussão geral e considerações finais 124
7.1 DISCUSSÃO GERAL 125
7.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS 129
REFERÊNCIAS 130

CONTEXTO E ESTRUTURA DA TESE



CONTEXTO E ESTRUTURA 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.

Neste contexto, a presente tese está organizada em capítulos, de forma a agrupar os temas relacionados, de acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, publicado em 09/09/2014:

Capítulo 1. Introdução geral e objetivos.

Capítulo 2. Zebrafish: desenvolvimento e comportamento. Este capítulo apresenta os efeitos tóxicos do Ery, EryD e BR51 no desenvolvimento embrionário e na natação de larvas de zebrafish. Para isso, foram avaliadas as malformações morfológicas e as alterações na distância e tempo de natação dos organismos.

Capítulo 3. Zebrafish: detoxificação e estresse oxidativo. Este capítulo apresenta os efeitos pró-oxidantes do Ery, EryD e BR51 em embriões de zebrafish. Foram realizadas análises bioquímicas com o uso de biomarcadores enzimáticos e não-enzimáticos do sistema de detoxificação e antioxidante dos organismos, e avaliado o estresse oxidativo pela determinação da peroxidação lipídica.

Capítulo 4. Zebrafish: neurotoxicidade e balanço energético. Este capítulo apresenta os efeitos do Ery, EryD e BR51 na alocação de energia celular e na atividade colinérgica de embriões de zebrafish. Para isso, foram avaliadas as reservas energéticas dos organismos com a quantificação dos lipídios, carboidratos e proteínas totais, e o consumo de energia com a determinação das atividades macroenzimáticas do sistema de transporte de elétrons. A atividade de neurotransmissão foi determinada com a atividade enzimática da acetilcolinesterase.

Capítulo 5. *Daphnia magna:* ciclo de vida, taxa de respiração e comportamento. Este capítulo apresenta os efeitos tóxicos do Ery, EryD e BR51 no consumo de oxigênio, na natação e durante o ciclo de vida completo dos organismos. Para isso, foi determinado o consumo de oxigênio, e monitoradas a atividade, distância e tempo de natação dos organismos. O ciclo de vida foi avaliado com a contagem do número de descendentes e com o cálculo da taxa intrínseca de crescimento populacional.

Capítulo 6. Saúde humana: hepatócitos e epiderme. Este capítulo apresenta os efeitos tóxicos do Ery em hepatócitos humanos imortalizados (HepG2) e epiderme humana equivalente (EHE) construída com queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Foram realizadas avaliações do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do Ery em HepG2 e do potencial citotóxico e genotóxico do Ery em EHE.

Capítulo 7. Discussão geral e considerações finais.

Capítulo

01

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).

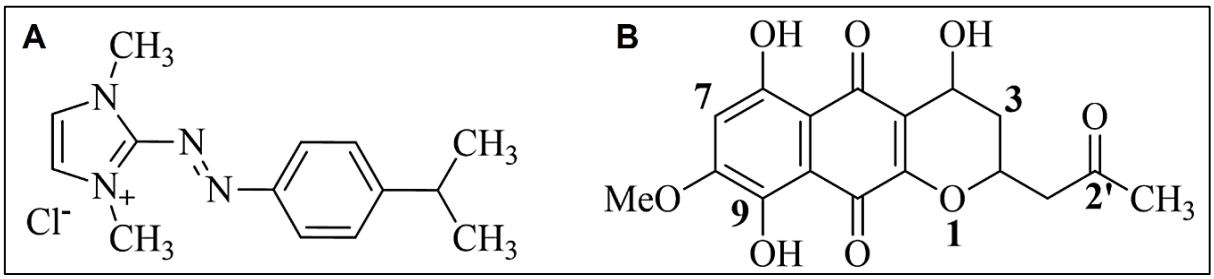
Com a produção em larga escala, as perdas para o ambiente também são consideráveis. Aproximadamente 2% dos corantes são perdidos durante o seu processo de produção, até 50% são perdidos na etapa de tintura de indústrias têxteis, e cerca de 70% são perdidos na água de lavagem de tinturas de cabelo. Consequentemente, 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 *Salmonela 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 apresentaram, por exemplo, atividades anti-inflamatórias, antimicróbicas, antioxidantes e anticânceres (KITTAKOOP 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; KITTAKOOP et al., 1999; UNAGUL et al., 2005; PRATHUMPAI et al., 2007), e possui bioatividade antimalárica e antioxidante (KITTAKOOP 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 contminantes 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*)

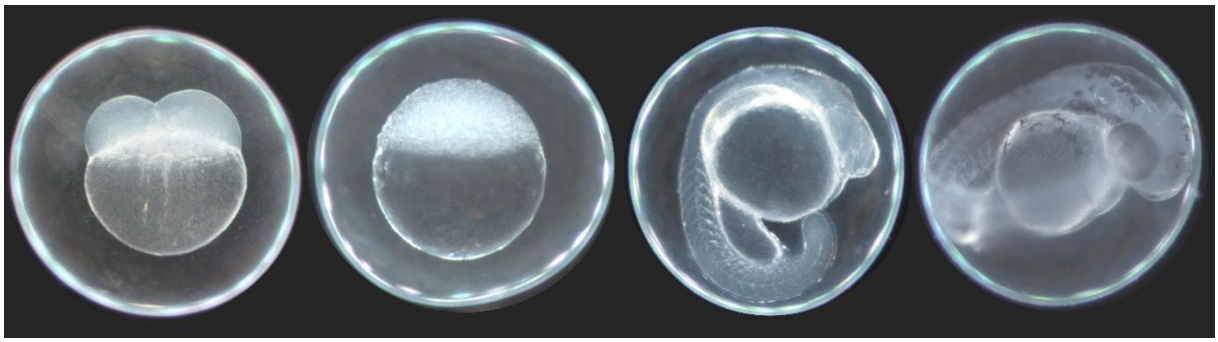
Capa: Exemplares de zebrafish (*Danio rerio*). Fonte: http://www.tecam.com.br/segmentos/ambiental/.

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 à 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 as 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)



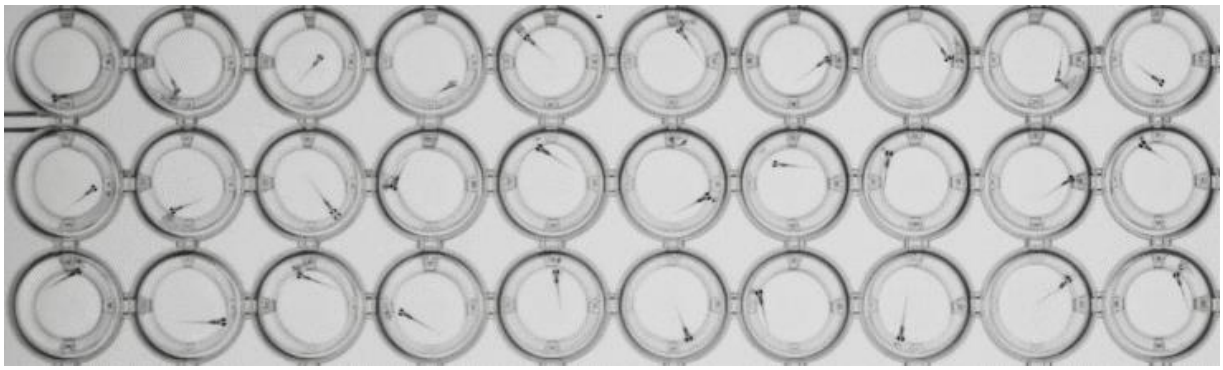
Capa: Desenvolvimento embrionário de zebrafish (*Danio rerio*). Fonte: próprio autor. Aumento 40 ×.

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 extretamente 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).

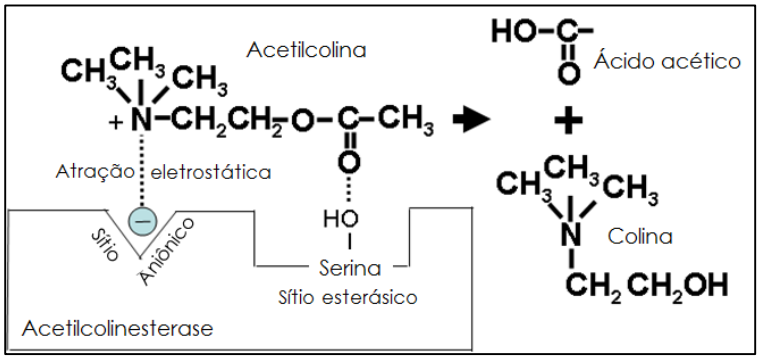
Alguns estudos evidenciaram que as alterações em biomarcadores bioquímicos ocorrem em concentrações abaixo daquelas capazes de alterar o desenvolvimento embrionário de zebrafish (DOMINGUES et al., 2010; VAN BOXTEL et al., 2010; ZHANG et al., 2012; PÉREZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; ANDRADE et 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.

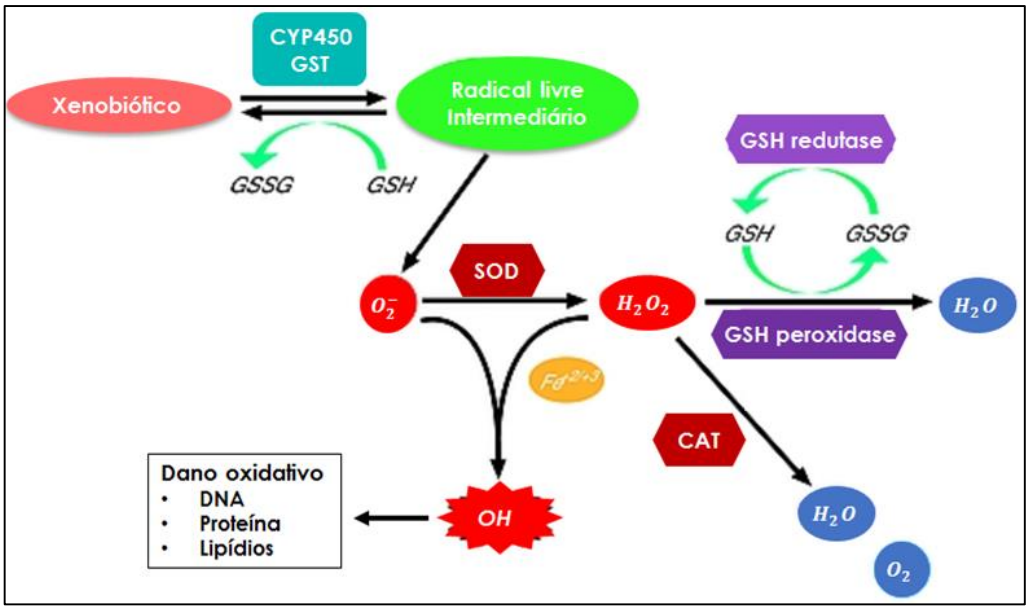
1.2.1.3.2 Biomarcadores de detoxificação e estresse oxidativo

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 glutationa S-transferase (GST) é a principal enzima desta fase, relacionada com a conjugação das moléculas com a glutationa (GSH), um tripeptídio 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 glutationa 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: glutationa S-transferase, GSH: glutationa reduzida, GSSG: glutationa 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 fosfolipídeos 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 espéries reativas de oxigênio (EROs). LH: cadeia de lipídios poli-insaturados; $R^{\bullet}$: radical livre reativo; $OH^{\bullet}$: espécie reativa de oxigênio; $L^{\bullet}$: radical lipídico centrado no carbono; $LOO^{\bullet}$: radical peroxila; LOOH: hidroperóxido de lipídio.

Iniciação da peroxidação lipídica:

$$LH + R^{\bullet} \text{ ou } OH^{\bullet} = L^{\bullet} + RH \text{ ou } HOH$$

Propagação da peroxidação lipídica:

$$L^{\bullet} + O_2 = LOO^{\bullet}$$

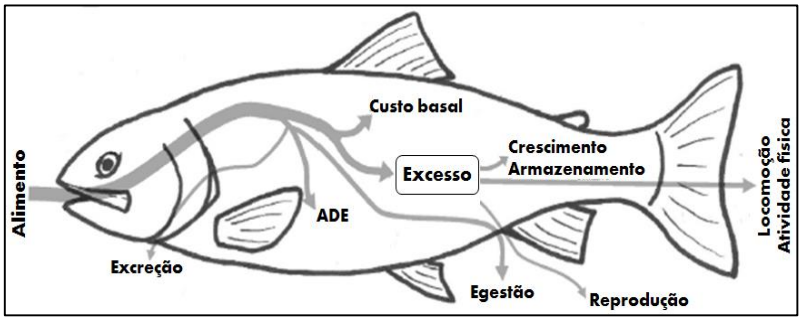
$$LH + LOO^{\bullet} = L^{\bullet} + LOOH$$

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 o 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).

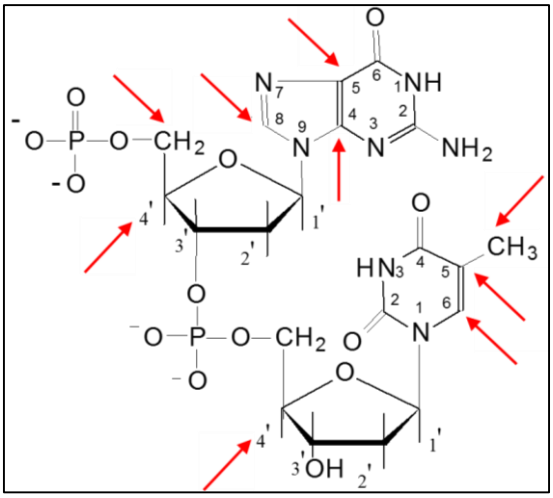
1.2.1.4 Genotoxicidade

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 genotoxidade, 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 ($OH^{\bullet}$), 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 $OH^{\bullet}$ 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.

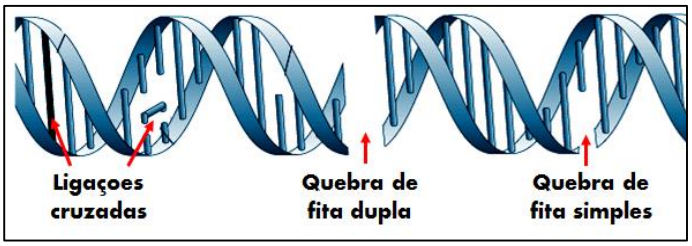
Figura 6. Esquema com algumas regiões do DNA susceptíveis à ataques por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (setas vermelhas). O esquema contém as bases nitrogenadas guanina (purina) e timina (pirimidina) ligadas à cadeia de pentose-fosfato.



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*

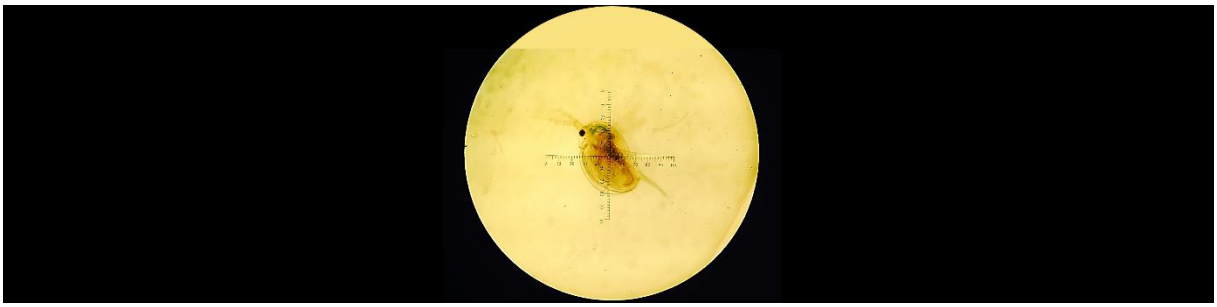
Capa: Exemplar de *Daphnia similis*. Fonte: http://www.aplysia.com.br/pt/servicos/areas/ecotoxicologia/.

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



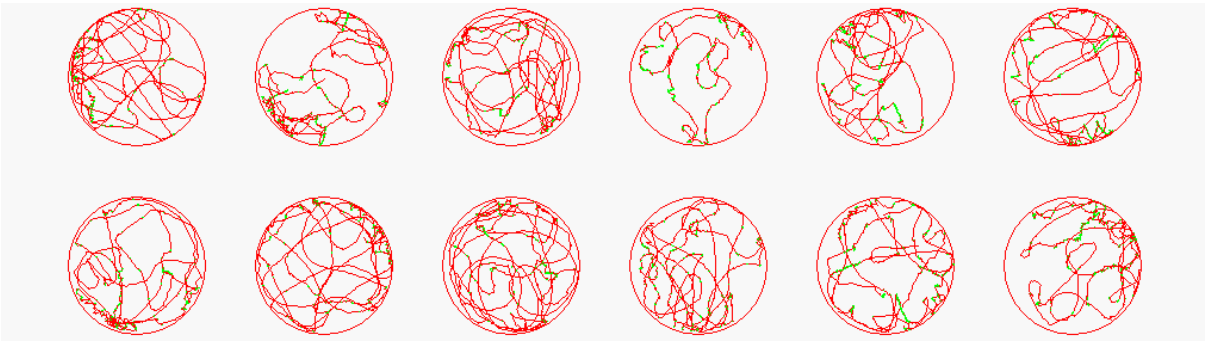
Capa: Exemplar de *Daphnia similis*. Fonte: http://www.aplysia.com.br/pt/servicos/areas/ecotoxicologia/.

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



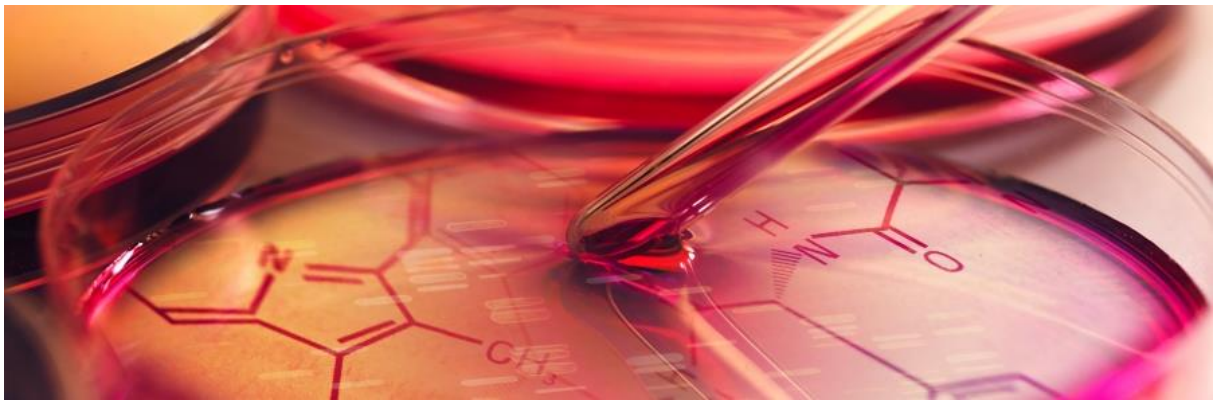
Capa: Rastreamento da natação de *Daphnia magna*. Fonte: próprio autor.

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



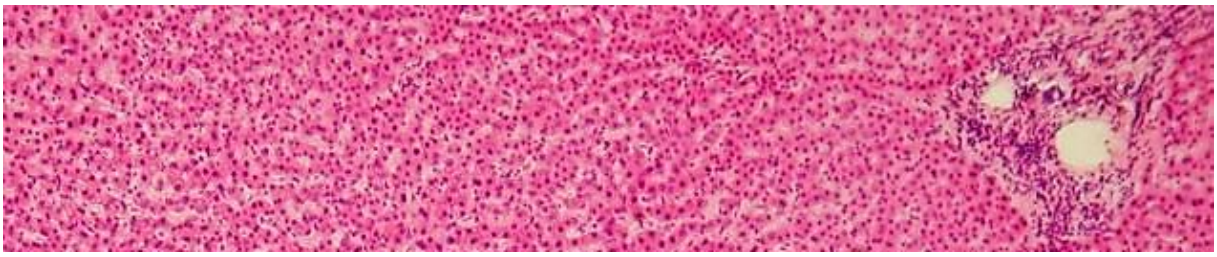
Capa: Cultura celular. Fonte: http://isic.net.br/artigo-40.

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

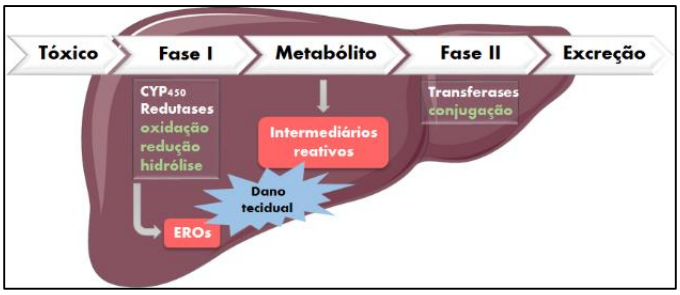


Capa: Corte histológico de fígado humano. Fonte: Reytan, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_liver.jpg.

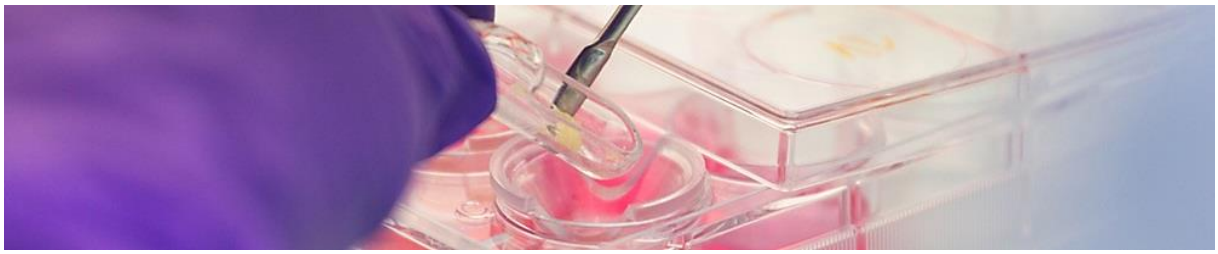
O fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos devido à habilidade dos hepatócitos de expressar quantitativamente enzimas de detoxificação de fase I e II, responsáveis por uma série de reações que facilitam a excreção dos xenobióticos ou os tornam metabolicamente reativos (Figura 8). 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, peroxidades, NAD(P)H:citocromo *c* redutases, CYP450 redutases e NAD(P)H:quinona oxidoredutases) e fase II (sulfotransferases, UDP glucuronil transferases, N-acetil transferases, glutationa 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

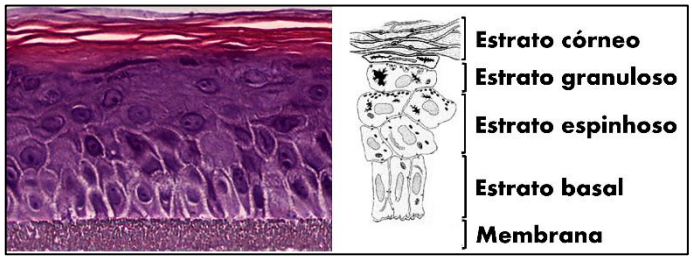


Capa: Epiderme humana reconstruída. Fonte: http://www.episkin.com/en/Training.

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 µm, coloração H.E.). Esquema das correspondentes camadas da epiderme.



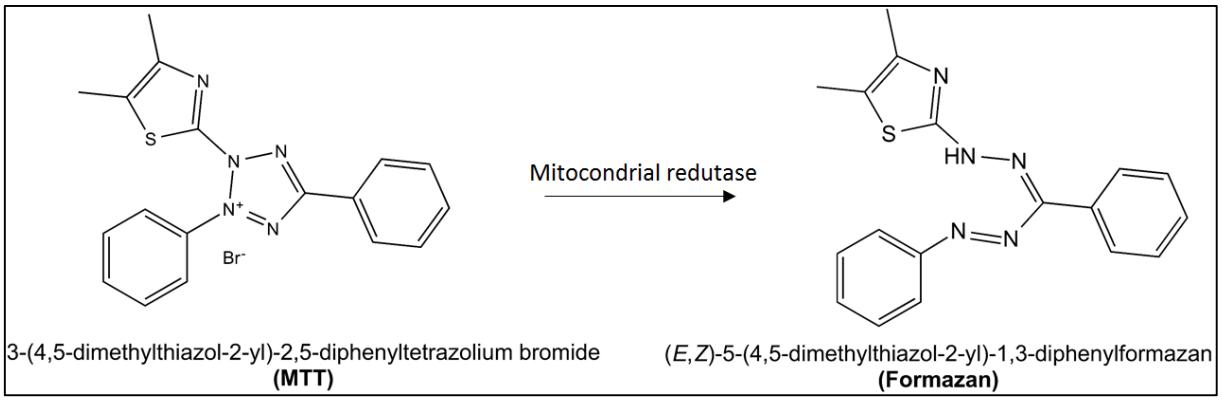
Fonte: adaptado de: EpiCS®, http://reconstructed-human-epidermis.com/overv iew/background/.

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 oncose, 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).

Ensaios 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.



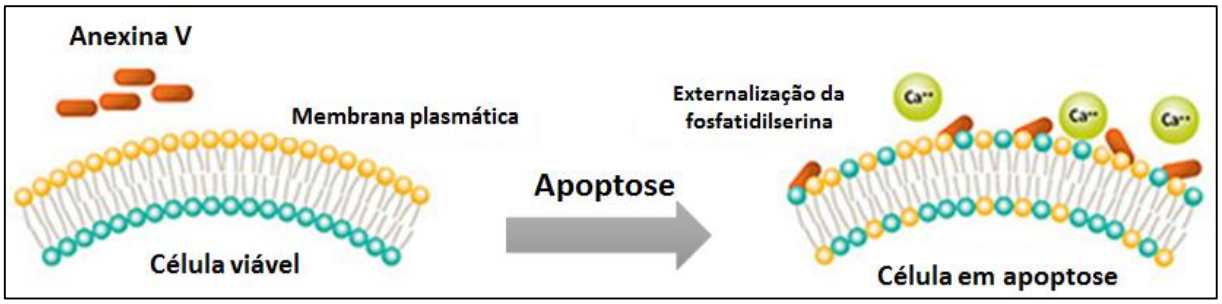
Fonte: adaptado de Rogan Grant, https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMTT_reaction.png.

Ensaios 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.

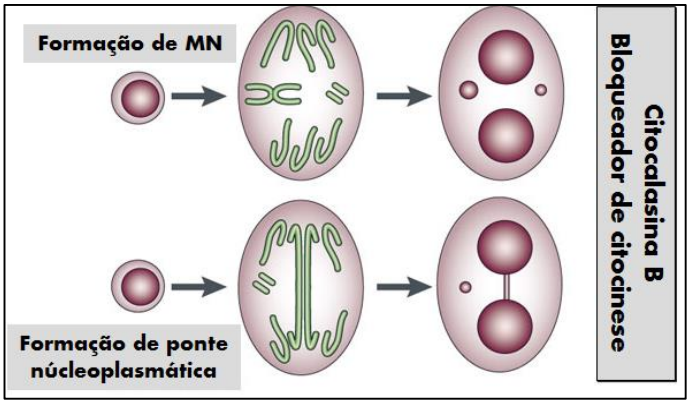
1.3.4 Genotoxicidade e mutagenicidade

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 acêntricas 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 getético 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 ecogenotoxicológico do Ery e do EryD em comparação com o BR51 para os organismos aquáticos, e o potencial ecogenotoxicológico 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.

Capítulo

02

ZEBRAFISH:
desenvolvimento e comportamento

\\

Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life

Flavia R. Abe,[1,2] Jacqueline N. Mendonça,[3] Luiz A.B. Moraes, [3] Gisele A.R. de Oliveira,[4] Carlos Gravato,[2] Amadeu M.V.M. Soares,[2] Danielle P. de Oliveira,[1]

[1]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [2]Department of Biology and Centre of Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal. [3]Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [4]Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, 74605-170, Goiânia, Goiás, Brazil.

*corresponding author: frabe@usp.br

Chemosphere 178 (2017) 282-290.

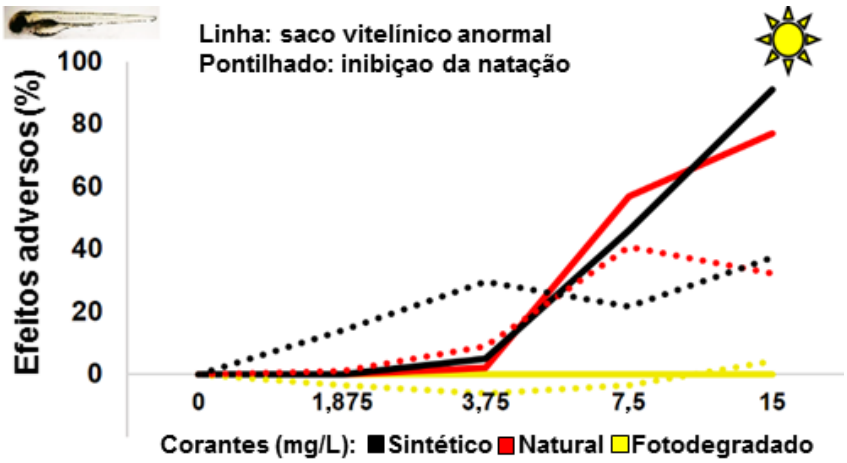
DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.030

2.1 Resumo

Testes toxicológicos em organismos não-alvos são fundamentais para o desenvolvimento de corantes seguros ao ambiente, e os estágios iniciais de vida do peixe zebrafish tem se destacado como organismos modelos para ambientes aquáticos. No presente trabalho, nós objetivamos avaliar e comparar os efeitos tóxicos do corante sintético Basic Red 51 (BR51), amplamente utilizado por indústrias têxteis e de cosméticos, e do corante natural eritrostominona (Ery), extraído de fungos com potencial aplicabilidade industrial. Adicionalmente, objetivamos avaliar a capacidade de fotodegradação de ambos os corantes, seguida da avaliação dos efeitos tóxicos dos produtos fotodegradados. Para tanto, foram avaliados os efeitos letais, subletais e teratogênicos induzidos no desenvolvimento embrionário de zebrafish e as alterações no comportamento larval de zebrafish. Nossos resultados mostraram que embriões expostos ao BR51 e Ery exibiram um saco vitelínico de tamanho anormal, possivelmente devido a uma deformidade ou atraso na reabsorção do vitelo. O Ery também induziu edemas de pericárdio e saco vitelínico em altas concentrações. Além disso, larvas expostas ao Ery e BR51 nadaram distâncias mais curtas e por menos tempo, comparadas aos controles. Estes efeitos na locomoção foram associados não somente ao desenvolvimento anormal do saco vitelínico, mas também à efeitos que antecipam as alterações morfológicas, uma vez que eles foram detectados em concentrações 4 vezes menores que as capazes de alterar o desenvolvimento embrionário. Interessantemente, após a exposição à luz, o BR51 permaneceu inalterado, enquanto o Ery formou um produto de degradação incolor (EryD), incapaz de afetar o desenvolvimento e o comportamento dos organismos, o qual mostra que a fotodegradação do Ery foi suficiente para prevenir os efeitos tóxicos avaliados. Em conclusão, ambos os corantes Ery e BR51 alteram o desenvolvimento e comportamento dos estágios iniciais de zebrafish, e um tratamento simples do corante natural pode prevenir impactos aos organismos não-alvos analisados.[1]

Palavras-chaves: Eritrostominona, Basic Red 51, malformações, atividade locomotora.

Resumo gráfico



Fonte: Adaptado de Abe et al. (2017a). Copyright 2017 Elsevier Ltd.

[1] **Os dados referentes à este capítulo foram publicados no periódico *Chemosphere* (Anexo 1)**. Abe, F.R.; Mendonça, J.N.; Moraes, L.A.B.; Oliveira, G.A.R.; Gravato, C.; Soares, A.M.V.M.; Oliveira, D.P. (2017a) Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. 178 282-290. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.030.

2.2 Abstract

Organic dyes extracted from natural sources have been widely used to develop safety and eco-friendly dyes as an alternative to synthetic ones, since the latter are usually precursors of mutagenic compounds. Thereby, toxicity tests to non-target organisms are critical step to develop harmless dyes to environment and in this context, zebrafish (*Danio rerio*) early life stages are becoming an important alternative model. We aimed to assess the toxic effects of the synthetic dye Basic Red 51 (BR51, used in cosmetic industry), the natural dye erythrostominone (Ery), a potential commercial dye extracted from fungi) and its photodegradation product (EryD), using zebrafish early life assays. Developmental malformations on embryos and behavioral impairment on larvae were explored. Our results showed that embryos exposed to BR51 and Ery exhibited a large yolk sac, possibly due to a deformity or delayed resorption. Ery also induced pericardial and yolk sac edemas at high concentrations. Moreover, larvae swan less distance and time when exposed to Ery and BR51. The lowest larvae locomotion have been associated with impairment of the yolk sac, important tissue of the energy source. Interestingly, EryD did not affect neither development nor behavior of zebrafish, showing that Ery photodegradation is sufficient to prevent its toxic effects. In conclusion, both natural and synthetic dyes impaired development and behavior of zebrafish early life, therefore, a simple treatment of the natural dye can prevent the aquatic life impact.

2.3 Introdução

A identificação de corantes seguros para o ambiente é fundamental para prevenir efeitos nocivos a organismos não-alvos . O zebrafish (*Danio rerio*) é um importante modelo para a (eco)toxicologia, com desenvolvimento incial bem caracterizado e embriões transparentes, o que permite a observação detalhada da organogênese, além da fácil manutenção em laboratório (BRAUNBECK et al., 2005; LAMMER et al., 2009; KNOBEL et al., 2012; SCHOLZ, 2013). O teste de embriotoxicidade em peixes (FET) foi proposto por Nagel (2002) para avaliar alterações morfológicas como alternativa aos testes agudos em peixes adultos. Recentemente, ensaios de comportamento do zebrafish também foram propostos como indicadores de efeitos adversos iniciais, com respostas de elevada sensibilidade quando comparadas aos tradicionais testes de toxicidade (MACPHAIL et al., 2009; PADILLA et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos tóxicos do BR51, Ery e também o seu produto fotodegradável (EryD) para os estágios iniciais de vida do zebrafish, utilizando os seguintes parâmetros: sobrevivência, desenvolvimento e comportamento. O FET foi realizado em embriões de zebrafish, a fim de investigar os efeitos de BR51, Ery e EryD na sobrevivência e em malformações induzidas durante o desenvolvimento embrionário. O comportamento foi avaliado pela atividade locomotora, com determinações da distância e do tempo gasto na natação, bem como a velocidade das larvas de zebrafish expostas aos corantes.

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Corantes em estudo

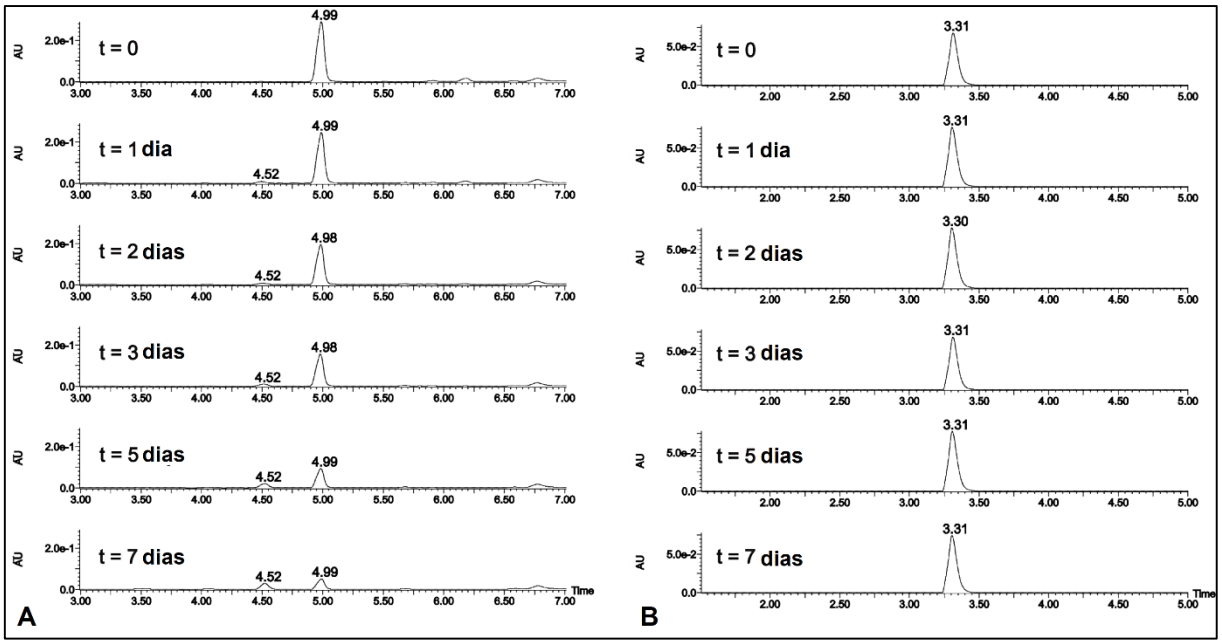
O corante sintético BR51 (2-(((4-dimethyllamino) phenyl) azo)-1,3-dimethyl-1H-imidazolium chloride, CAS n.º 77061-58-6, MW: 279,6 g/mol, pureza 99%) (Figura 1A) foi adquirido da LCW Import and Export Ltd (São Paulo, Brasil). O corante natural Ery (CAS n.º 26153-04-8, MW: 348,08 g/mol, pureza 85-92%) foi extraído de fungo endofítico cepa LC01-A (espécie em fase de identificação, cedida pela Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental, CCMA, EMBRAPA, Brasil), purificado e caracterizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de Química da FFCLRP, USP, Ribeirão Preto, Brasil).

Soluções estoques do BR51 foram diretamente preparadas em água de osmose reversa, e diluídas na mesma água imediatamente antes do início dos testes. Soluções estoques do Ery foram preparadas em dimetil sulfoxido (DMSO) e diluídas em água de osmose reversa (DMSO 0,01%, v/v) imediatamente antes do início dos testes. Água de osmose reversa e DMSO 0,01% em água de osmose reversa (v/v) foram usados como controles negativos, e 3,4-dicloroanilina (DCA 4 mg/L) como controle positivo.

2.4.2 Fotodegradação dos corantes

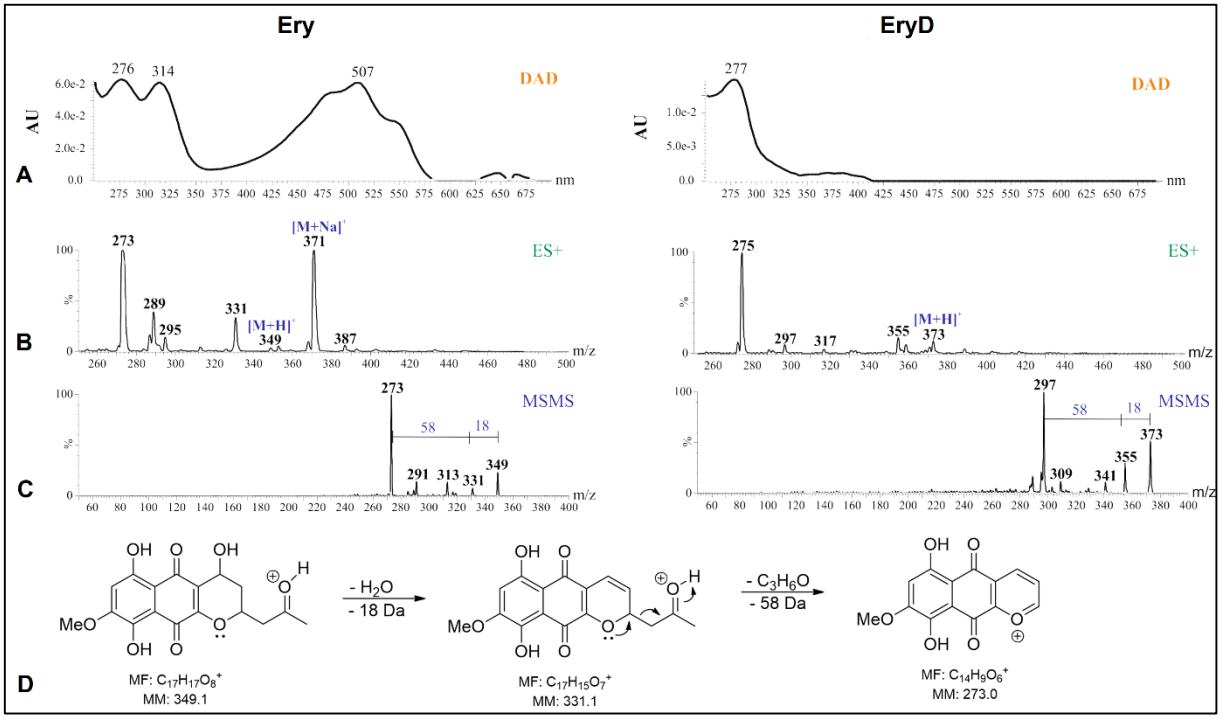
Soluções testes do BR51 e Ery (30 mg/L, ambas preparadas em DMSO 0,01% em água de osmose reversa, v/v, para tornar as soluções iguais) foram devidamente alocadas em tubos de centrífuga estéreis de 50 mL vedados com *Parafilm M*® e expostas a luz fluorescente branca constante (250 lx, 36W) durante 7 dias. Amostras foram coletadas com 1, 2, 3, 5 e 7 dias de exposição e analisadas em UPLC-DAD-MS pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes da FFCLRP, USP (Ribeirão Preto, Brasil). As soluções do BR51 permaneceram inalteradas, enquanto a fotodegradação do Ery formou um segundo composto incolor, confirmado pela diminuição do sinal em 4.99 min e um aumento do sinal em 4.52 min (Figura 13 e Figura 14). Sendo assim, foi testado o composto degradado do Ery (EryD) para avaliar uma possível alternativa de tratamento de efluentes industriais contendo o mesmo.

Figura 13. Cromatogramas em diferentes tempos adquiridos em 315 nm para eritrostominona (A) e em 295 nm para Basic Red 51 (B). Análises realizadas pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes da FFCLRP, USP.



Fonte: adaptado de Abe et al. (2017a). Copyright 2017 Elsevier Ltd.

Figura 14. Espectrograma UV/vis (A), espectrograma MS (B) e espectrograma MSMS (C) do eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradado (EryD), e fragmentação do Ery (D). Análises realizadas pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes da FFCLRP, USP.



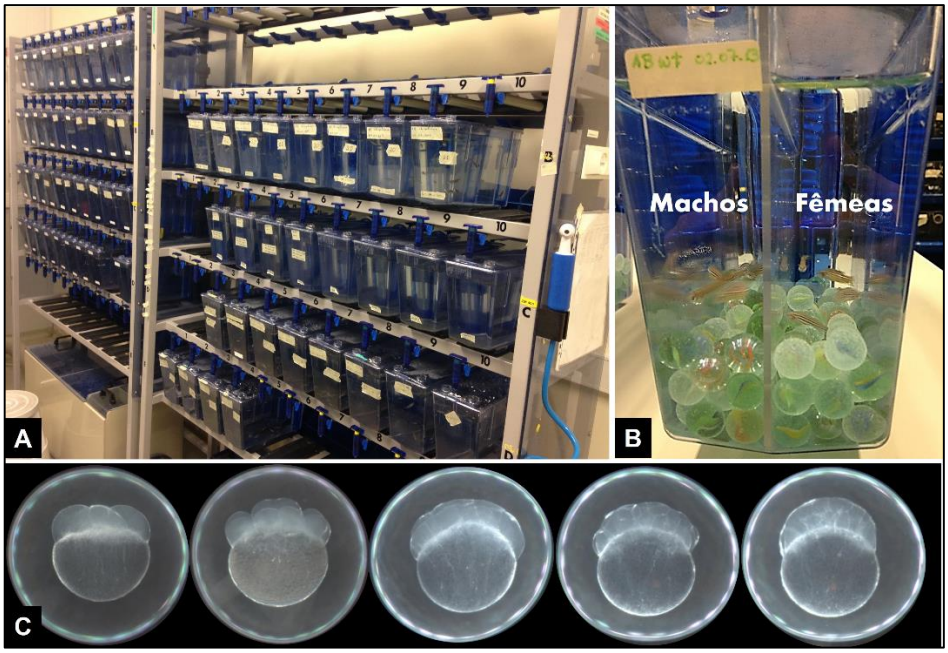
Fonte: adaptado de Abe et al. (2017a). Copyright 2017 Elsevier Ltd.

2.4.3 Manutenção de zebrafish e obtenção dos ovos

Os testes de toxicidade com zebrafish foram realizados no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal). Culturas de zebrafish (linhagem AB) do biotério local foram mantidas em aquários de 3,5 L com densidade de 3-6 adultos/L, em sistema de fluxo contínuo equipado com filtro de carbono (ZebTec, Tecniplast, Itália) (Figura 15A), a pH 7,5 ± 0,5, temperatura de 26 ± 1ºC, oxigênio dissolvido a 95% de saturação, condutividade de 750 ± 50 µS/cm, e fotoperíodo de 16:8 h. Os organismos foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (ZM400 Granular).

Para a obtenção dos ovos, fêmeas e machos adultos (1:2) foram alocados separadamente em aquário contendo divisória transparente vazada, permitindo a troca de água entre os compartimentos (Figura 15B). Com o início do fotoperíodo na manhã seguinte, a divisória foi retirada e os peixes desovaram por 1 h. Decorrido o tempo, os ovos foram coletados e lavados em água autoclavada. Os ovos fertilizados em período de clivagem (4-64 células) (Figura 15C) foram selecionados em estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) e utilizados nos ensaios subsequentes, aleatoriamente designados aos tratamentos. Os embriões e larvas não receberam alimentação exógena durante os ensaios, uma vez que até 144 horas pós fertilização (hpf) ainda se alimentam do vitelo.

Figura 15. Biotério de zebrafish. (A) Sistema de manutenção ZebTec (Tecniplast, Itália). (B) Aquário com divisória utilizado para a reprodução de zebrafish. (C) Ovos de zebrafish em período de clivagem com 4, 8, 16, 32 e 64 células, respectivamente, da esquerda para a direita.

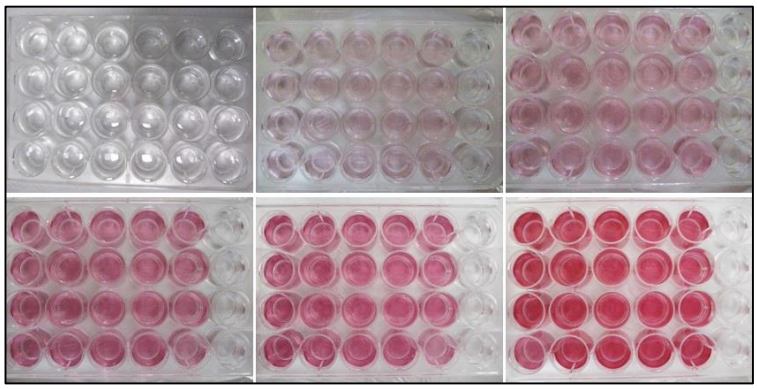


2.4.4 Teste de embriotoxicidade em peixes (FET)

As alterações no desenvolvimento embrionário de zebrafish foram avaliadas de acordo com a OECD *Guideline 236* (2013) e Nagel (2002). O projeto foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCFRP, USP (CEUA, protocolo número 14.1.608.53.5, emitido em 12 de novembro de 2014).

Os ovos selecionados foram individualmente distribuídos em placas para cultura celular de 24 poços, contendo 2 mL de solução teste cada poço. Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e positivo, 6 concentrações do Ery e EryD (1,88; 3,75; 7,5; 15, 30 e 50 mg/L) e 7 do BR51 (1,88; 3,75; 7,5; 15, 30, 50 e 100 mg/L). Testes foram realizados em quadruplicatas independentes, e cada tratamento foi realizado com 20 repetições, sendo um organismo por repetição (n=4×20 embriões/tratamento) (Figura 16). As placas foram mantidas até 96 hpf a 26 ± 1ºC, em sistema estático e no escuro para evitar a degradação dos corantes.

Figura 16. Exposição de embriões de zebrafish ao corante eritrostominona (Ery) em placas para cultura celular de 24 poços. Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle negativo; 1,88; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg/L de Ery.

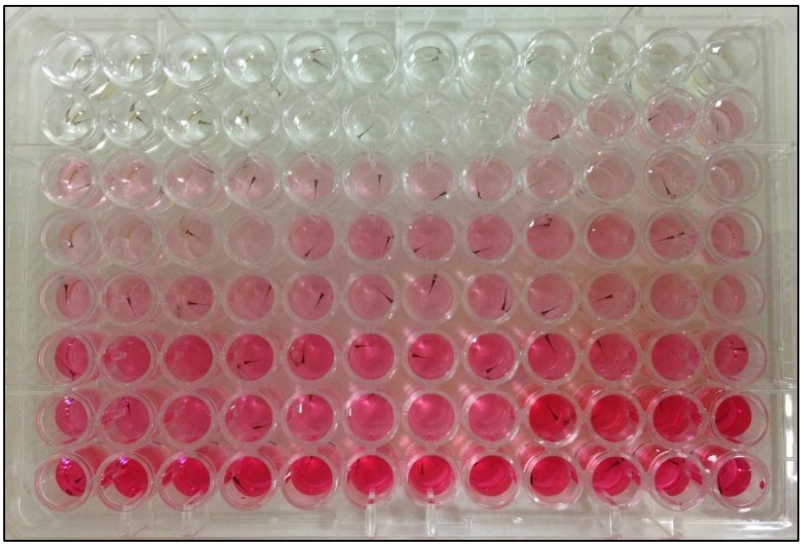


Os embriões foram monitorados diariamente em estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) acoplado com câmera (LV-TV, Nikon, Japão). Os indicadores analisados foram de letalidade (coagulação dos ovos, ausência de somitos, cauda presa e ausência de batimentos cardíacos), sub-letalidade (malformação dos somitos e dos olhos, pigmentação e edemas) e teratogenicidade (malformações da cabeça, cauda e otólitos, deformidades do saco vitelino, crescimento retardado, escoliose e não eclosão) (NAGEL, 2002).

2.4.5 Ensaio de comportamento

O comportamento de zebrafish foi monitorado de acordo com os procedimentos previamente descritos por Macphail et al. (2009), Padilla et al. (2011) e Henriques et al. (2015). Os ovos selecionados foram distribuídos em placas de Petri contendo 50 mL de solução teste, sendo 10 ovos/placa e 3 placas/tratamento. Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e 4 concentrações subletais do Ery, EryD e BR51 pré-selecionadas a partir do FET (1,88; 3,75; 7,5 e 15 mg/L). As placas foram mantidas a 26 ± 1ºC, em sistema estático e no escuro para evitar a degradação dos corantes. Ao completar 144 hpf, quando as larvas já possuem bexiga natatória inflada, 20 larvas por tratamento foram individualmente transferidas para placas para cultura celular de 96 poços (n=20 larvas/tratamento) contendo 200 µL de solução teste (Figura 17), definindo as dimensões da área experimental em 6,5 mm (diâmetro do poço) × 5,5 mm (altura atingida pela solução teste no poço). O rastreamento da locomoção foi realizado sempre no mesmo período do dia (1 p.m.), utilizando o sistema de rastreamento de vídeo ZebraBox e ZebraLab software (ViewPoint Life Science, Lyon, França).

Figura 17. Exposição de embriões de zebrafish ao corante Basic Red 51 (BR51) em placas para cultura celular de 96 poços pouco antes do rastreamento. Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle negativo; 1,88; 3,75; 7,5 e 15 mg/L de BR51.



Os 10 min iniciais de rastreamento foram realizados no escuro como período de aclimatação para minimizar distúrbios causados na transferência das larvas. Decorrido o período, foram gravados 4 ciclos consecutivos de 10 min cada, alternando claro e escuro, sendo

utilizado iluminação LED para os ciclos no claro e luz infravermelha para os ciclos no escuro. Foi utilizado fundo transparente com limite de detecção de 25 frames por segundo para a detecção das larvas, e a distância mínima de 0,5 mm foi definida como "inativo" para evitar rastreamento de ruído do sistema. Os dados foram automaticamente amostrados a cada 60 segundos (período de integração), com a obtenção dos seguintes parâmetros por larva: tempo total de natação (TTN em s/min), distância total de natação (DTN em mm/min) e velocidade (Vel em mm/s). Ao final do teste, as larvas foram analisadas em estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) para verificar a inflação da bexiga natatória, uma vez que a não inflação pode prejudicar a natação (STRAHLE et al., 2012).

2.4.6 Análises Estatísticas

Após verificar a distribuição e variância dos dados do FET e do ensaio de comportamento de zebrafish (normalidade e homocedasticidade) com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Barlett, respectivamente, foi aplicada One-way ANOVA seguida do teste de Dunnett (nível de significância de 5%) para verificar diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e seus respectivos controles negativos, utilizando o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os valores de Concentração de Efeito Observado (CEO) e Concentração de Efeito Não-Observado (CENO) também foram definidos. A concentração letal média (CL_{50}), concentração efetiva média (CE_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança (limites superiores e inferiores) foram calculados pelo método trimmed Spearman-Karber (HAMILTON et al., 1977). Os corantes foram classificados de acordo com as categorias de perigo agudo para o ambiente aquático definidos pelo *Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals* (GHS, 2009).

2.5 Resultados

2.5.1 FET

Os valores calculados das CL_{50}, CE_{50} e CEO para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na

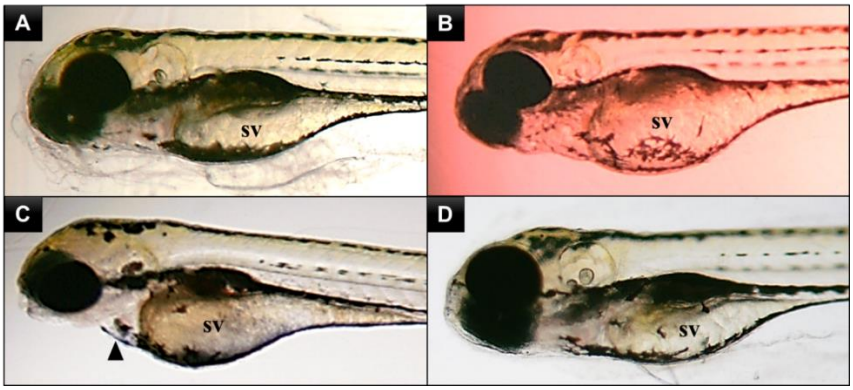
Tabela 1, e os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 2. Em geral, os embriões dos controles negativos apresentaram desenvolvimento regular como descrito por

Nagel (2002), enquanto o controle positivo (DCA 4 mg/L) induziu mortalidade superior a 30%, como recomendado pela OECD *Guideline 236* (2013). Em relação à exposição aos corantes, o BR51 e Ery induziram malformações durante o desenvolvimento embrionário e alterações na natação das larvas de zebrafish, comparados aos respectivos controles, enquanto o EryD não alterou nenhum dos parâmetros analisados.

Houve um aumento significativo na mortalidade dos embriões somente em elevadas concentrações do BR51 (CEO=50 mg/L) e Ery (CEO=30 mg/L). Entretanto, concentrações subletais de ambos os corantes induziram um saco vitelínico perceptivelmente maior (Figura 18B e C) de forma dose e tempo-dependente. O saco vitelínico anormal foi inicialmente visualizado nos embriões expostos ao Ery com 48 hpf (CEO=15 mg/L) e nos expostos ao BR51 com 72 hpf (CEO=7.5 mg/L), aumentando significativamente ao longo das concentrações (Figura 19) e do tempo de exposição (Tabela 1). Além disso, o Ery induziu edemas de saco vitelínico (CEO=30 mg/L) e de pericárdio (CEO=15 mg/L) (Tabela 1, Figura 18C). Não houveram efeitos adversos induzidos pelo Ery e BR51 em relação aos outros parâmetros avaliados: coagulação dos ovos, cauda presa, ausência ou malformações dos somitos, pigmentação anormal, malformações dos olhos, cauda e otólitos, escoliose e crescimento retardado.

Baseado na classificação do GHS (2009), o BR51 e Ery são prejudiciais (CL_{50}>100 mg/L e 10<CL_{50}≤100 mg/L, respectivamente) a tóxicos (1<CE_{50}≤10 mg/L) para o ambiente aquático. Por outro lado, o EryD não induziu nenhuma alteração significativa no desenvolvimento embrionário de zebrafish (Tabela 1, Figura 18D).

Figura 18. Embriotoxicidade em zebrafish com 96 hpf. Embriões expostos ao (A) controle negativo; (B) 7,5 mg/L de Basic Red 51 com saco vitelínico anormal; (C) 7,5 mg/L de eritrostominona com saco vitelínico anormal e edema de pericárdio; (D) 30 mg/L de eritrostominona degradado; sv: saco vitelínico, cabeça da seta: edema de pericardio (amplificação 30x).



Fonte: adaptado de Abe et al. (2017a). Copyright 2017 Elsevier Ltd.

Tabela 1. Valores da CEO e CENO, CL_{50} e CE_{50} (intervalos de confiança: limite inferior – LI, limite superior – LS) (mg/L) do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para embriões de zebrafish, e classificação para o perigo aquático agudo (GHS, 2009).

	hpf	Mortalidade			Saco vitelínico anormal			Edema de saco vitelínico		Edema de pericárdio		Classificação
		CENO	CEO	CL_{50} (LI-LS)	CENO	CEO	CE_{50} (LI-LS)	CENO	CEO	CENO	CEO	
EryD	48	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	72	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	96	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Ery	48	–	–	–	7,5	15	18,89 (16,3-22)	15	30	–	–	Prejudicial a tóxico
	72	30	50	–	3,75	7,5	11,71 (8,5-16,2)	15	30	15	30	
	96	15	30	26,68 (22,7-31,5)	3,75	7,5	9,88 (5,6-17,6)	*	*	7,5	15	
BR51	48	50	100	–	–	–	–	–	–	–	–	Prejudicial a tóxico
	72	50	100	–	3,75	7,5	12,04 (10,4-13,9)	–	–	–	–	
	96	30	50	> 100	3,75	7,5	7,39 (6,5-8,4)	–	–	–	–	

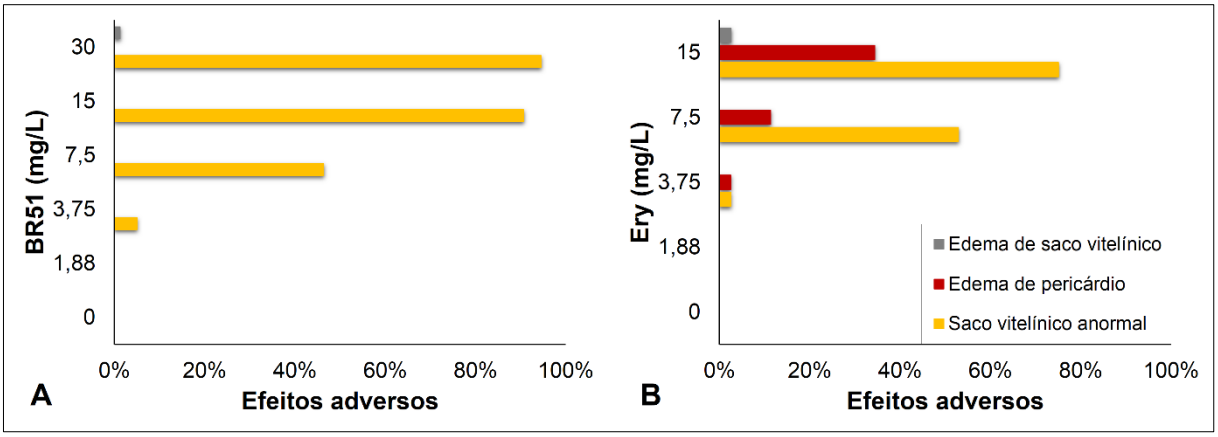
–nenhum efeito significativo; *não calculado devido a ocorrência de mortalidade; hpf: horas pós-fertilização. Adaptado de Abe et al. (2017a). Copyright 2017 Elsevier Ltd.

Tabela 2. Valores da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para o FET em zebrafish.

Parâmetro	Tempo (hpf)	Resultados ANOVA					
		BR51		Ery		EryD	
Mortalidade	48	$F_{(7;30)}=3$	p=0,0175	$F_{(6;21)}=1$	p=0,4500	$F_{(6;21)}=0,67$	p=0,6974
	72	$F_{(7;30)}=5,7$	p=0,0003	$F_{(6;21)}=2,9$	p=0,0327	$F_{(6;21)}=0,67$	p=0,6974
	96	$F_{(7;30)}=35$	p<0,0001	$F_{(6;21)}=14$	p<0,0001	$F_{(6;21)}=0,67$	p=0,6974
Saco vitelínico anormal	48	$F_{(7;30)}=0,84$	p=0,5614	$F_{(6;21)}=110$	p<0,0001	$F_{(6;21)}=1,3$	p=0,3074
	72	$F_{(7;29)}=73$	p<0,0001	$F_{(6;21)}=120$	p<0,0001	$F_{(6;21)}=1,3$	p=0,3074
	96	$F_{(7;29)}=110$	p<0,0001	$F_{(6;20)}=52$	p<0,0001	$F_{(6;21)}=1,5$	p=0,1924
Edema de saco vitelínico	48	–	–	$F_{(6;21)}=32$	p<0,0001	–	–
	72	–	–	$F_{(6;21)}=42$	p<0,0001	–	–
	96	$F_{(7;29)}=1$	p=0,4237	*	*	–	–
Edema de pericárdio	48	–	–	$F_{(6;21)}=0,81$	p=0,5370	–	–
	72	–	–	$F_{(6;21)}=40$	p<0,0001	–	–
	96	–	–	$F_{(6;21)}=10$	p<0,0001	–	–

–nenhum efeito significativo; *não calculado devido a ocorrência de mortalidade; hpf: horas pós-fertilização.

Figura 19. Malformações induzidas em zebrafish com 96 hpf. Valores apresentados em porcentagem de efeitos adversos (edemas de saco vitelínico e pericárdio, e saco vitelínico anormal) induzidos pelo (A) Basic Red 51 (BR51) e (B) eritrostominona (Ery) em embriões vivos, excluindo as concentrações com elevada mortalidade.



2.5.2 Comportamento

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 3. A avaliação da atividade locomotora foi realizada em cinco ciclos alternados de claro e escuro de 10 min cada, com início no ciclo escuro como período de aclimatação. De modo geral, as larvas de zebrafish dos grupos controles apresentaram distâncias totais de natação (DTN) e tempos totais de natação (TTN) mais longos durante os ciclos no escuro, e reduziram rapidamente a DTN e TTN durante os ciclos no claro. Estes resultados estão em acordo com o padrão de comportamento de larvas de zebrafish, como previamente reportado por MacPhail et al. (2009) e Padilla et al. (2011).

Em relação à exposição aos corantes, o BR51 e o Ery mostraram-se prejudiciais à atividade locomotora de larvas de zebrafish. Durante os ciclos de claro e escuro, o BR51 diminuiu a DTN, o TTN e a Vel de natação das larvas, enquanto o Ery diminuiu estes mesmos parâmetros somente durante os ciclos no escuro (Figura 20).

Considerando que as larvas expostas aos corantes apresentaram efeitos semelhantes nos dois ciclos do escuro, e os efeitos do BR51 foram mais acentuados no segundo ciclo do claro, os resultados referentes aos segundos ciclos de claro e de escuro estão apresentados na Figura 21 e na Tabela 3. O BR51 diminuiu a DTN e o TTN das larvas durante o ciclo no claro em concentrações a partir de 7,5 mg/L, enquanto que no subsequente ciclo no escuro, diminuiu a DTN e a Vel em todas as concentrações testadas (CEO=1,88 mg/L), e o TTN a partir de 15 mg/L. Em relação ao Ery, não houve alterações durante o ciclo no claro, mas no subsequente

ciclo do escuro as larvas expostas diminuíram a DTN, o TTN e a Vel em concentrações a partir de 7,5 mg/L. Por outro lado, o EryD não induziu nenhuma alteração significativa em relação ao controle em todos os parâmetros comportamentais analisados.

Figura 20. Atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas a 15 mg/L dos corantes eritrostominona (Ery), seu fotodegradado (EryD) e Basic Red 51 (BR51). Valores representados por média de larvas (n=20) por min. Cada ciclo de 10 min está representado por barras pretas (ciclo no escuro) e brancas (ciclo no claro).

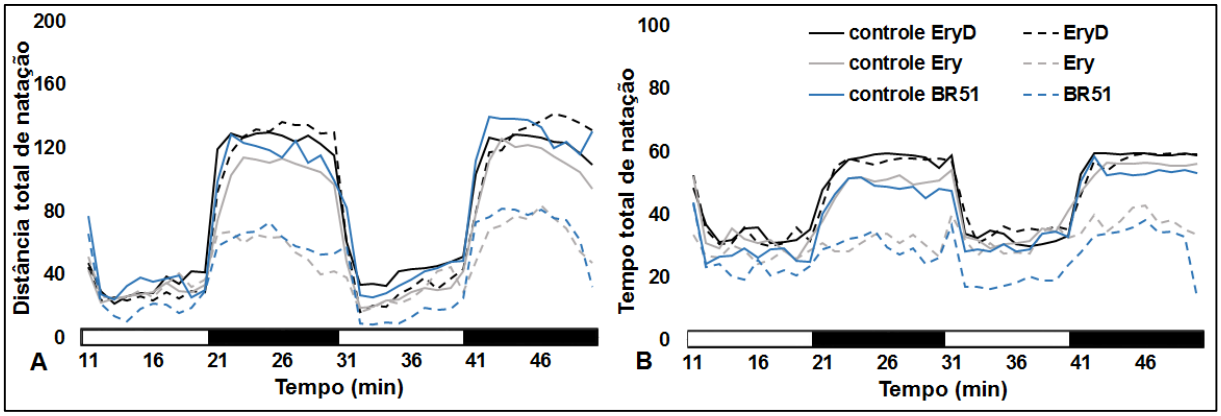
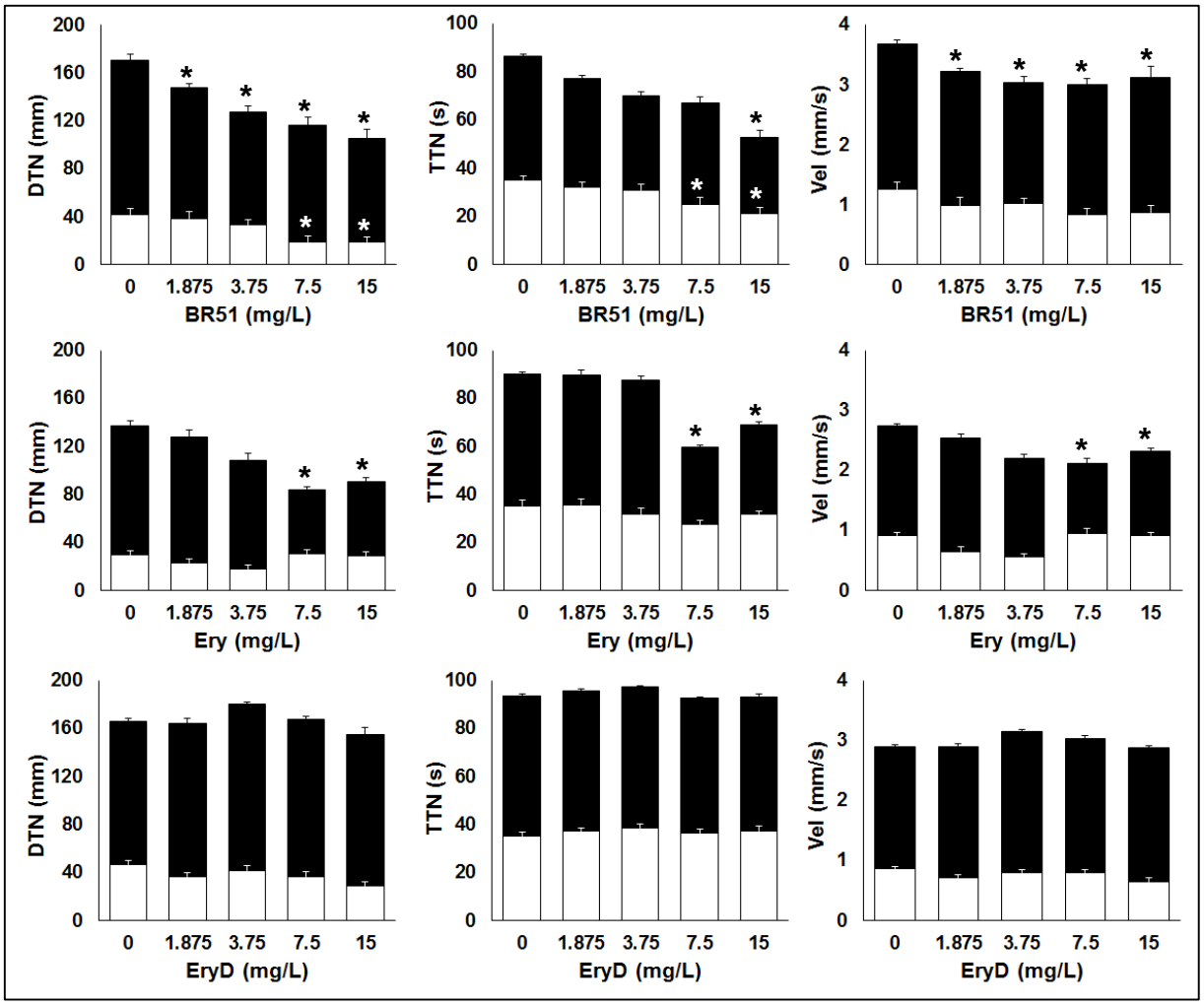


Tabela 3. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para o comportamento de zebrafish com 144 hpf.

		BR51			Ery			EryD	
		CEO	ANOVA		CEO	ANOVA		ANOVA	
DTN	Claro	7,5	$F_{(4;45)}=4,5$	$p=0,0040$	–	$F_{(4;45)}=1,8$	$p=0,1545$	$F_{(4;45)}=1,5$	$p=0,2060$
	Escuro	1,88	$F_{(4;45)}=11$	$p<0,0001$	7,5	$F_{(4;45)}=25$	$p<0,0001$	$F_{(4;45)}=2,5$	$p=0,0596$
TTN	Claro	7,5	$F_{(4;45)}=4,7$	$p=0,0029$	–	$F_{(4;45)}=2,3$	$p=0,0740$	$F_{(4;45)}=0,7$	$p=0,6024$
	Escuro	15	$F_{(4;45)}=9,0$	$p<0,0001$	7,5	$F_{(4;45)}=70$	$p<0,0001$	$F_{(4;45)}=2,1$	$p=0,0914$
Vel	Claro	–	$F_{(4;45)}=2,0$	$p=0,1099$	–	$F_{(4;45)}=1,9$	$p=0,1345$	$F_{(4;45)}=0,9$	$p=0,4943$
	Escuro	1,88	$F_{(4;45)}=7,8$	$p<0,0001$	7,5	$F_{(4;45)}=21$	$p<0,0001$	$F_{(4;45)}=2,2$	$p=0,0790$

-nenhum efeito significativo, DTN: distância total de natação (mm), TTN: tempo total de natação (s), Vel: velocidade (mm/s).

Figura 21. Atividade locomotora de zebrafish com 144 hpf expostos aos corantes. Ciclos de 10 min no claro (barras brancas) e no escuro (barras pretas). DTN: distância total de natação, TTN: tempo total de natação, Vel: velocidade. Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle.



Fonte: adaptado de Abe et al. (2017a). Copyright 2017 Elsevier Ltd.

2.6 Discussão

O corante sintético BR51 e o natural Ery mostraram ser prejudiciais aos embriões e larvas de zebrafish. Ambos os corantes induziram mortalidade apenas em concentrações elevadas, entretanto em concentrações subletais mostraram ser tóxicos ao desenvolvimento embrionário e ao comportamento natatório das larvas.

De acordo com a elevada faixa de letalidade do BR51 (CL_{50}>100 mg/L) e Ery (10<CL_{50}≤100 mg/L) para embriões de zebrafish, eles são classificados como prejudiciais para a vida aquática em exposições agudas (GHS, 2009). Dados referentes a valores de CL_{50} de corantes para peixes em estágio inicial de desenvolvimento são escassos, todavia, alguns estudos realizados com peixes adultos também reportaram elevados valores de CL_{50}. O corante

azo vermelho de metilo, por exemplo, é letal para adultos de *Poecilia reticulata* somente em elevadas concentrações, com 96-h CL_{50}=27,2 mg/L (SHARMA et al., 2003), enquanto a anilina, uma amina aromática usada como produto intermediário na síntese de corantes azo, apresenta 96-h CL_{50}=69,4 mg/L para *Oreochromis mossambicus* adultos (BHUNIA et al., 2003).

Apesar da mortalidade observada nos embriões de zebrafish somente em concentrações elevadas, os efeitos subletais se iniciaram em concentrações muito abaixo. As alterações morfológicas nos embriões expostos ao BR51 e ao Ery ocorreram entre $1<CE_{50}\leq10$ mg/L, o que classifica os corantes como tóxicos para a vida aquática em exposições prolongadas (GHS, 2009). O BR51, em particular, induziu efeitos subletais em concentrações até 53 vezes mais baixas que a CL_{50}>100 mg/L. O *gap* entre efeitos letais e subletais induzidos pelo BR51 também é induzido por outros corantes azo, como o azo Disperse Red 1, que apresenta 72-h CL_{50}=75,58 mg/L para cnidários *Hydra attenuate*, enquanto que a 72-h CE_{50} para alterações morfológicas é de 1,07 mg/L (JONG et al., 2016). Da mesma forma, apesar da elevada 96-h CL_{50} da anilina para *Oreochromis mossambicus*, 0,02 mg/L já reduz a eficiência de conversão alimentar e a taxa de crescimento dos organismos (BHUNIA et al. 2003).

Em relação às alterações na morfologia dos embriões de zebrafish, o Ery induziu edemas de saco vitelino e de pericárdio em elevadas concentrações, os quais estão associados à falhas na função da permeabilidade da membranas para o balanço osmótico (HILL et al., 2004; TSURUWAKA et al., 2015) e nas funções renais de zebrafish (HANKE et al., 2013). Entretanto, o mecanismo de atuação do Ery não foi elucidado. Tsuruwaka et al. (2015) discute que os edemas de pericárdico em embriões de zebrafish estão associados a um anormal padrão de sinalização intracelular de Ca^{2+}, o que de fato pode ter sido alterado pelo Ery, uma vez que a absorção de compostos lipofílicos afeta a sinalização de Ca^{2+} devido à elevada afinidade aos fosfolipidios da membrana (ALVES et al., 2004).

O BR51 e o Ery também alteraram o tamanho do saco vitelínico dos embriões expostos a concentrações subletais. Os embriões apresentaram um saco vitelínico de maior tamanho, possivelmente devido a uma deformidade do saco ou reabsorção retardada do vitelo. Embora não haja informações sobre a toxicidade dos corantes para o desenvolvimento de embriões de zebrafish, sabe-se que o saco vitelínico é um importante tecido envolvido na organogênese e secreção de fatores de crescimento e proteínas, também importante para o sistema imunológico, com atuação na maturação de macrófagos, na fagocitose de células apoptóticas e invasores

microbianos, e na secreção de citocinas (HERBOMEL et al., 1999; HERBOMEL et al., 2001; BERTRAND et al., 2007). O saco vitelínico também desempenha o papel fundamental de armazenamento de energia associado à alimentação endógena de embriões e larvas de zebrafish, os quais iniciam a alimentação exógena somente após 120 hpf (STRAHLE et al., 2012). Portanto, uma deficiência no tecido fonte de energia dos embriões pode culminar em alterações no sistema imunológico e no desenvolvimento/crescimento dos organismos.

Apesar disso, os embriões expostos ao BR51 e Ery apresentaram crescimento regular, sugerindo que a energia consumida do vitelo estava sendo adequadamente alocada para o crescimento. Para investigar se outras funções de gasto energético poderiam ser prejudicadas, o comportamento das larvas de zebrafish foi monitorado, e verificou-se que a atividade locomotora de larvas de zebrafish foi reduzida, em acordo com associações já reportadas previamente entre malformações e problemas locomotores (HENRIQUES et al., 2015; ANDRADE et al., 2016). As larvas expostas ao BR51 e ao Ery nadaram distâncias mais curtas e por menos tempo em concentrações que apresentaram o saco vitelínico anormal, sugerindo que o saco vitelínico de maior tamanho pode estar associado à hipoatividade das larvas. De um ponto de vista ecológico, alterações na atividade locomotora de larvas de peixe pode comprometer as interações presa/predador e a sobrevivência (FINGER et al., 1985). Burgess e Granato (2007) sugerem que as respostas locomotoras de larvas de zebrafish frente as mudanças de iluminação estão relacionadas ao comportamento da alimentação, ao risco de predação ou à busca por refúgio. Desta forma, a menor atividade locomotora durante os períodos de luz e escuro pode prejudicar a procura por alimentos e aumentar os riscos de predação, diminuindo as chances de sobrevivência dos organismos no ambiente natural.

Considerando que cerca de 15-50% dos corantes das indústrias têxteis são liberados para os recursos hídricos (NOJAVAN et al., 2013), e atingem desde concentrações traços (µg/L) até 500 mg/L em águas residuais industriais (O'NEILL et al., 1999), as concentrações subletais do BR51 e Ery capazes de induzir efeitos adversos no desenvolvimento e no comportamento do zebrafish são prováveis de serem encontradas no ambiente. Um tratamento ineficiente de efluentes industriais antes da sua liberação para os corpos d’água seria suficiente para culminar em concentrações tóxicas dos corantes no ambiente. Neste trabalho, nós demonstramos que após exposição a luz durante 7 dias, o Ery tornou-se incolor e o produto fotodegradado não apresentou toxicidade ao desenvolvimento embrionário e à atividade locomotora de zebrafish, mostrando uma redução e/ou inativação eficaz da toxicidade do Ery. A fácil fotodegradação do Ery em um produto não prejudicial ao ambiente traz algumas vantagens, dentre elas a rapidez,

simplicidade e baixo custo para tratamentos de efluentes contendo o corante, quando comparada aos métodos laboriosos utilizados em águas residuais contendo corantes azo, como os tratamentos fotoelectrocatalíticos, adsorventes e processo fenton-coagulação (FRAGA et al., 2013; FRAGA; ZANONI, 2011; SHARMA et al., 2011; ZHANG et al., 2014). Levando em conta a busca por corantes ecologicamente corretos para aplicações industriais, a fotodegradação do Ery mostrou ser uma técnica importante para as indústrias em relação ao tratamento de efluentes.

Por fim, os dados aqui apresentados também mostraram que o FET e o teste comportamental possuem sensibilidades próximas. Entretanto, as alterações no comportamento foram detectadas em concentrações 4 vezes menores do que as observadas no FET. Henriques et al. (2015) também mostraram uma redução na atividade locomotora de larvas de zebrafish expostas ao gemfibrozil em concentrações até 2 vezes menores às observadas no ensaio FET. Já o fungicida carbendazim alterou a atividade locomotora de larvas de zebrafish em concentrações centenas de vezes menores do que aquelas observadas no FET (ANDRADE et al., 2016). Apesar das evidências de que a toxicidade aguda dos peixes é altamente correlacionadas com a dos embriões (KNOBEL et al., 2012; LAMMER et al., 2009), as informações sobre a capacidade metabólica de embriões de zebrafish são escassas e insuficientes. Knobel et al. (2012) relatou uma baixa sensibilidade de embriões de zebrafish a compostos que requerem metabolização para bioativação. É particularmente importante compreender se o BR51 é prejudicial para os organismos após sua metabolização, uma vez que foi previamente demonstrado que este corante azo forma aminas aromáticas mutagênicas e/ou carcinogênicas após sua clivagem (EU SCCS/1436/11; ZANONI et al., 2014; TAFURT-CADORNA et al., 2015).

2.7 Conclusão

Em síntese, considerando as respostas morfológicas e comportamentais obtidas para embriões e larvas de zebrafish, os estágios iniciais de vida mostraram ser um modelo relevante para avaliar efeitos subletais de xenobióticos. O teste FET apontou malformações no saco vitelínico induzidas pelo Ery e BR51, enquanto o ensaio comportamental mostrou-se mais sensível, detectando comprometimento na natação locomotora em concentrações sem alterações morfológicas. No entanto, mostramos que o Ery pode ser facilmente fotodegradado em um composto que não induz em nenhum efeito adverso significativo sobre os estágios

iniciais de vida do zebrafish nas condições testadas, enquanto a BR51 não se degrada após a exposição à luz, sugerindo um potencial do Ery para aplicações industriais como *eco-friendly*.

ANEXO 1

Chemosphere 178 (2017) 282-290

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life

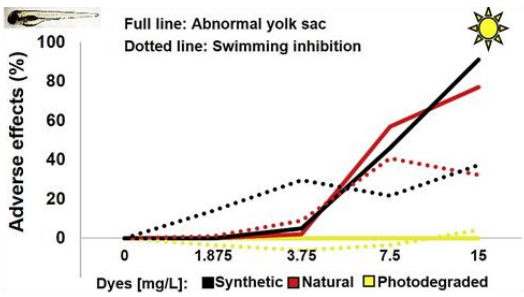
Flavia R. Abe [a, b, *], Jacqueline N. Mendonça [c], Luiz A.B. Moraes [c], Gisele A.R. de Oliveira [d], Carlos Gravato [b], Amadeu M.V.M. Soares [b], Danielle P. de Oliveira [a]

[a] School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[b] Department of Biology and Centre of Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal
[c] Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[d] Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, 74605-170, Goiânia, Goiás, Brazil Goiânia

HIGHLIGHTS

- Natural and synthetic dyes induced malformation effects to zebrafish early life.
- Zebrafish larvae swam less when exposed to natural and synthetic dyes.
- Photodegraded natural dye did not induce any adverse effect in zebrafish early life.
- Behavioral assay has higher sensitivity towards malformations detection.
- A multiparameter approach promotes the assessment of ecological relevant effects.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLEINFO

Article history:
Received 17 November 2016
Received in revised form
7 March 2017
Accepted 8 March 2017
Available online 9 March 2017

Handling Editor: David Volz

Keywords:
Erythrostominone
Basic Red 51
Malformation
Locomotor activity
Light degradation

ABSTRACT

Organic dyes extracted from natural sources have been widely used to develop safety and eco-friendly dyes as an alternative to synthetic ones, since the latter are usually precursors of mutagenic compounds. Thereby, toxicity tests to non-target organisms are critical step to develop harmless dyes to environment and in this context, zebrafish early life stages are becoming an important alternative model. We aimed to assess the toxic effects of the synthetic dye Basic Red 51 (BR51, used in cosmetic industry), the natural dye erythrostominone (ERY, a potential commercial dye extracted from fungi) and its photodegradation product (DERY), using zebrafish early life assays. Developmental malformations on embryos and behavioral impairment on larvae were explored. Our results showed that embryos exposed to BR51 and ERY exhibited a large yolk sac (LOEC = 7.5 mg L^{-1}), possibly due to a deformity or delayed resorption. ERY also induced pericardial and yolk sac edemas at high concentrations (LOEC = 15 and 30 mg L^{-1}, respectively). Moreover, larvae swan less distance and time when exposed to ERY (LOEC =7.5 mg L^{-1}) and BR51 (LOEC =1.875 mg L^{-1}). The lowest larvae locomotion have been associated with impairment of the yolk sac, important tissue of the energy source. Interestingly, DERY did not affect neither development nor behavior of zebrafish, showing that ERY photodegradation is sufficient to prevent its toxic effects. In conclusion, both natural and synthetic dyes impaired development and behavior of zebrafish early life, therefore, a simple treatment of the natural dye can prevent the aquatic life impact.

* Corresponding author. School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.
E-mail address: frabe@usp.br (F.R.Abe).

http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.030
0045-6535/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Capítulo

03

ZEBRAFISH:
detoxificação e estresse oxidativo

Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish

Flavia R. Abe,[1,2] Carlos Gravato,[2] Amadeu M.V.M. Soares,[2] Danielle P. de Oliveira,[1]

[1]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [2]Department of Biology and Centre of Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

*corresponding author: frabe@usp.br

Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A (2017).

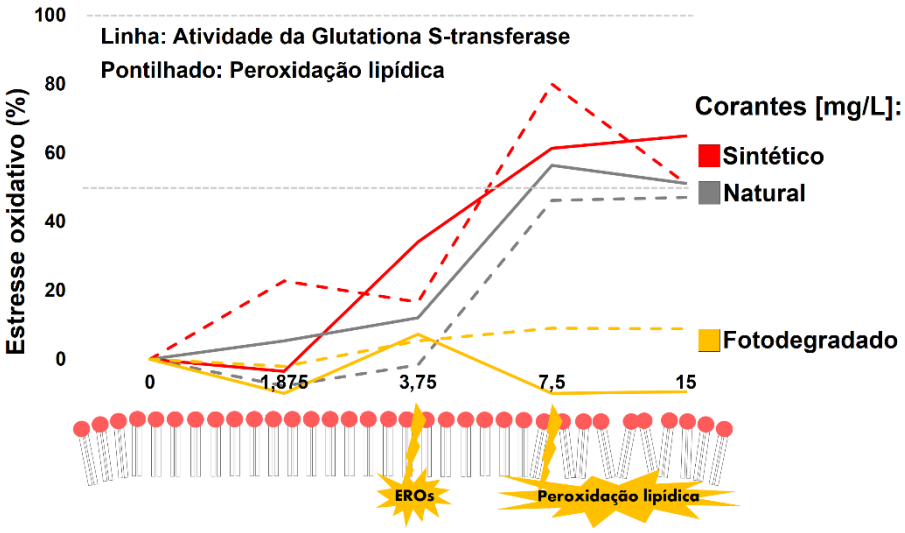
DOI: 10.1080/15287394.2017.1371091

3.1 Resumo

Os estágios iniciais da vida do zebrafish mostraram-se sensíveis a vários compostos químicos amplamente distribuídos no ambiente. No entanto, concentrações ambientais de contaminantes são encontradas muitas vezes em níveis subletais, sendo necessários métodos mais sensíveis para determinar os efeitos tóxicos subletais. O objetivo deste estudo foi utilizar biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade para compreender os efeitos de estresse oxidativo desencadeados por concentrações subletais do corante azo sintético Basic Red 51 (BR51), do corante natural eritrostominona (Ery) e seu produto fotodegradado (EryD) em embriões de zebrafish. Biomarcadores incluíram marcadores do sistema de desintoxicação e antioxidantes, de danos oxidativos e danos no DNA. Os resultados mostraram efeitos pró-oxidantes atribuídos a BR51 e Ery, evidenciado pelo aumento da atividade enzimática da glutationa S-transferase (GST), uma enzima de detoxificação da fase II do metabolismo relacionada à detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O BR51 também elevou a atividade da catalase (CAT), uma enzima antioxidante, e os níveis da glutationa total (GSH + GSSG), proteínas importantes que atuam no sistema de detoxificação e antioxidante. No entanto, ambos os corantes induziram dano oxidativo evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica. Em contraste, quando o corante natural foi fotodegradado, nenhum efeito significativo foi observado para todos os biomarcadores avaliados. Os dados indicam que tais corantes são pró-oxidantes em concentrações subletais, envolvendo predominantemente a GSH e/ou vias de enzimas relacionadas. Os dados também indicam uma nova possibilidade para um corante *eco-friendly* como alternativa para as indústrias em relação aos tratamentos de efluentes, tornando-se mais seguro para a saúde ambiental.[2]

Palavras-chaves: Basic Red 51, eritrostominona, pró-oxidante, peroxidação lipídica.

Resumo gráfico



Fonte: Adaptado de Abe et al. (2017b). Copyright 2017 Taylor & Francis.

[2] **Os dados referentes à este capítulo (exceto dados de genotixicidade) foram publicados no periódico *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* (Anexo 1)**. Abe, F.R.; Gravato, C.; Soares, A.M.V.M.; Oliveira, D.P. (2017b) Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish. DOI: 10.1080/15287394.2017.1371091.

3.2 Abstract

Zebrafish early life stages were found to be sensitive to several synthetic dyes widely used in industries. However, as environmental concentrations of such contaminants are often at sublethal levels, more sensitive methods are required to determine early-warning adverse consequences. The aim of this study was to utilize a multibiomarker approach to examine underlying oxidative stress mechanisms triggered by sublethal concentrations of synthetic azo dye Basic Red 51 (BR51), the natural dye erythrostominone (Ery), and its light-degraded product (EryD) using zebrafish embryos. Biochemical biomarkers included parameters of detoxification and markers of antioxidant system, as well as oxidative damage. Results showed prooxidant mechanisms attributed to BR51 and Ery as evidenced by increased glutathione S-transferase (GST) activity, a phase II detoxification enzyme related to reactive oxygen species detoxification. BR51 also elevated total glutathione (GSH+GSSG) levels and catalase activity. However, both dyes induced oxidative damage as evidenced by elevated lipid peroxidation content. In contrast, when the natural dye was photodegraded, no marked effects were observed for all biomarkers assessed. Data indicate that such dyes are pro-oxidants at sublethal concentrations, predominantly involving GSH and/or related enzymes pathway.

3.3 Introdução

Biomarcadores bioquímicos são amplamente utilizados por ecotoxicologistas para determinar efeitos adversos em níveis subindividuais, devido à elevada sensibilidade dos indicadores (VAN BOXTEL et al. 2010; DOMINGUES et al., 2010; ZHANG et al., 2012; OLIVEIRA et al. 2013; Pérez et al. 2013; ANDRADE et al., 2016). Avanços significativos já foram alcançados no estabelecimento de biomarcadores de estresse oxidativo aplicados a organismos aquáticos expostos a uma variedade de poluentes químicos (VAN DER OOST et al., 2003; GRAVATO; GUILHERMINO, 2009; ZHANG et al., 2012; GRAVATO et al., 2014; KAUR e KAUR 2015; CAMPOS Jr. et al., 2016). Os processos de desintoxicação para xenobióticos são conhecidos por modular as enzimas de estresse oxidativo devido à maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZHANG et al., 2012).

Neste contexto, a utilização de biomarcadores para identificar corantes que exercem efeitos adversos em organismos não-alvos é relevante para evitar consequências nocivas e são indicadores confiáveis para prever potenciais efeitos irreversíveis sobre as populações expostas. O objetivo deste trabalho foi obter uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes às respostas de estresse oxidativo desencadeadas por concentrações subletais de corantes sintéticos e naturais nos estádios iniciais da vida do zebrafish.

3.4 Materiais e Métodos

3.4.1 Corantes em estudo

O corante sintético BR51 (2-(((4-dimethyllamino) phenyl) azo)-1,3-dimethyl-1H-imidazolium chloride, CAS n.º 77061-58-6, MW: 279,6 g/mol, pureza 99%) (Figura 1A) foi adquirido da LCW Import and Export Ltd (São Paulo, Brasil). O corante natural Ery (CAS n.º 26153-04-8, MW: 348,08 g/mol, pureza 85-92%) foi extraído de fungo endofítico cepa LC01-A (espécie em fase de identificação, cedida pela CCMA, EMBRAPA, Brasil), purificado e caracterizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de Química da FFCLRP, USP (Ribeirão Preto, Brasil).

Soluções estoques do BR51 foram diretamente preparadas em água de osmose reversa, e imediatamente diluídas na mesma água antes do início dos testes. Soluções estoques do Ery foram preparadas em dimetil sulfoxido (DMSO) e diluídas em água de osmose reversa (DMSO 0,01%, v/v) antes do início dos testes. Soluções do Ery degradado (EryD) foram preparadas previamente a partir de soluções testes do Ery (DMSO 0,01% em água de osmose reversa, v/v), expostas a luz branca constante (250 lx, 36W) durante 7 dias, e imediatamente utilizadas nos ensaios. Água de osmose reversa e DMSO 0,01% em água de osmose reversa (v/v) foram usados como controles negativos, e 3,4-dicloroanilina (DCA 2 mg/L) controle positivo.

3.4.2 Manutenção de zebrafish e obtenção dos ovos

Os ensaios foram realizados no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal). Culturas de zebrafish (linhagem AB) do biotério local foram mantidas em aquários de 3,5 L com densidade de 3-6 adultos/L, em sistema de fluxo contínuo equipado com filtro de carbono (ZebTec, Tecniplast, Itália) (Figura 15A), a pH 7,5 ± 0,5, temperatura de 26 ± 1°C, oxigênio dissolvido a 95% de saturação, condutividade de 750 ± 50 µS/cm, e fotoperíodo de 16:8 h. Os organismos foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (ZM400 Granular).

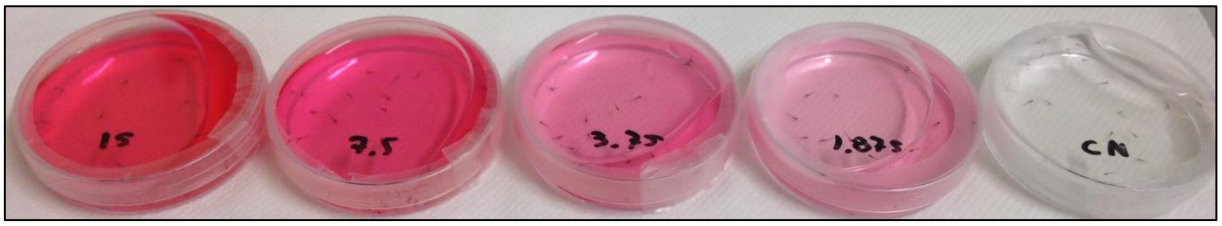
Para a obtenção dos ovos, fêmeas e machos adultos (1:2) foram alocados separadamente em aquário contendo divisória transparente vazada, permitindo a troca de água entre os compartimentos (Figura 15B). Com o início do fotoperíodo na manhã seguinte, a divisória foi retirada e os peixes desovaram por 1 h. Decorrido o tempo, os ovos foram coletados e lavados

em água autoclavada. Os ovos fertilizados em período de clivagem (4-64 células) (Figura 15C) foram selecionados em estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) e utilizados nos ensaios subsequentes, aleatoriamente designados aos tratamentos. Os embriões e larvas não receberam alimentação exógena durante os ensaios, uma vez que até 144 horas pós fertilização (hpf) ainda se alimentam do vitelo.

3.4.3 Biomarcadores bioquímicos

Os ovos selecionados foram distribuídos em placas de Petri contendo 50 mL de solução teste, sendo 25 ovos/placa e 6 placas/tratamento. Foram realizados os tratamentos dos controles negativos, controle positivo e 4 concentrações subletais do Ery e EryD e do BR51 (1,87; 3,75; 7,5 e 15 mg/L) (Figura 22). As placas foram mantidas a 26 ± 1ºC em sistema estático e no escuro para evitar a degradação dos corantes. Ao atingirem 96 hpf, 7 grupos contendo 19 embriões cada foram coletados por tratamento, totalizando 133 embriões por tratamento (n=7×19 embriões/tratamento). Durante a coleta, os grupos de embriões foram mantidos em microtubos de 2 mL submersos em gelo e imediatamente armazenados a -80ºC até as análises.

Figura 22. Exposição de embriões de zebrafish ao corante Basic Red 51 (BR51), durante 96 hpf. Da direita para esquerda: controle negativo; 1,88; 3,75; 7,5 e 15 mg/L de BR51.



No momento das análises, as amostras foram homogeneizadas em 1600 µL de água ultrapura, utilizando homogeneizador ultra-sônico (Ystral GmbH D-7801 Dottingen, Alemanha). Parte do homogenato foi separada em microtubos para análises de peroxidação lipídica (LPO), contendo 4 µL de 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) 4% em metanol (v/v), para impedir a auto-oxidação lipídica. A amostra restante foi centrifugada (10.000 × *g*, 20 min, 4ºC) (Eppendorf 5210F, Alemanha) para isolar a fração pós-mitocondrial, e separada em microtubos para as análises de catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST), glutationa total (GT) e determinação de proteínas. Todas as análises bioquímicas de cada repetição foram

determinadas em quadruplicatas a 25ºC em leitor de microplacas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, EUA).

3.4.3.1 Glutationa-S-transferase (GST - EC 2.5.1.18)

A atividade da GST foi determinada de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974) adaptado para microplacas por Frasco e Guilhermino (2002), pela quantificação da conjugação da glutationa reduzida (GSH) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). O homogenato foi adicionado a solução de reação contendo solução de GSH 10 mM em tampão fosfato-potássio 0,2 M (pH 6,5) (p/v), e CDNB 10mM em etanol (p/v). A atividade foi monitorada continuamente a 340 nm durante 5 min e expressa em nmol/min/mg proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,6 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$.

3.4.3.2 Catalase (CAT - EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com o método descrito por Clairborne (1985), medindo o declínio da absorbância devido ao consumo do substrato H_2O_2. O homogenato foi adicionado ao tampão de reação contendo H_2O_2 0,03 M em tampão fosfato-potássio 0,05 M (pH 7,0) (v/v). A atividade foi monitorada continuamente a 240 nm durante 2 min e expressa em µmol/min/mg proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de 40 $M^{-1}cm^{-1}$.

3.4.3.3 Glutationa total (GT)

Os níveis de GT (soma dos níveis de glutationa reduzida - GSH e glutationa oxidada - GSSG) foram determinados de acordo com Tietze (1969) e Baker et al. (1990), utilizando a reação da GSH com o 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) na presença de glutationa redutase (GR) em excesso. O homogenato foi adicionado ao tampão de reação contendo β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzida (NADPH) 5 mg/mL em tampão fosfato-potássio-sódio 0,2 M (pH 8,0) (p/v), DTNB e hidrocarbonato de sódio em tampão fosfato-potássio-sódio 0,2 M (pH 8,0) (p/v), e GR 168 U/mg proteína em tampão fosfato-potássio-sódio 0,2 M (pH 8,0) (p/v). A absorbância foi monitorada continuamente a 412 nm durante 3 min, e

os níveis foram expressos em µM/mg proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de $14,1 \times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$.

3.4.3.4 Peroxidação lipídica (LPO)

A LPO endógena foi determinada de acordo com o método descrito por Ohkawa (1979) e Bird e Draper (1984) adaptado por Filho et al. (2001) e Torres et al. (2002), pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A reação incluiu a mistura do homogenato com a solução de ácido tricloroacético (TCA) 100% em água ultrapura (p/v), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,73% em Tris-hidrocloreto (Tris-HCl) 60 mM com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) 0,1 mM (p/v). A mistura de reação foi incubada a 100ºC por 1 h protegida da luz, centrifugada (11.500 rpm, 5 min, 25°C) e imediatamente determinada a 535 nm. A atividade foi expressa em TBARS em por embrião (nmol TBARS/embrião), utilizando o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$.

3.4.3.5 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) adaptado para microplacas por Guilhermino et al. (1996), usando a γ-globulina bovina como padrão. As medidas foram realizadas espectrofotometricamente a 600 nm.

3.4.4 Genotoxicidade

A genotoxicidade foi determinada pelo ensaio do cometa, de acordo com Kosmehl et al. (2008) adaptado. Os ovos selecionados foram distribuídos em placas para cultura celular de 6 poços, contendo 10 mL de solução teste cada poço, sendo 5 ovos/poço e 4 poços/tratamento. Foram realizados os tratamentos dos controles negativos, controle positivo e 4 concentrações subletais do Ery e EryD e do BR51 (1,88; 3,75; 7,5 e 15 mg/L). As placas foram mantidas a 26 ± 1ºC em sistema estático e no escuro para evitar a degradação dos corantes. Ao atingirem 96 hpf, 20 embriões por tratamento foram coletados em microtubos de 1,5 mL e imediatamente eutanaziados (aproximadamente 20 min a -20ºC) para o ensaio do cometa. Os testes foram

realizados em triplicatas independentes, e cada tratamento foi realizado com 1 repetição, sendo 20 organismos por repetição (n=3×20 embriões/tratamento).

Após a eutanazia, os grupos de embriões foram ressuspendidos em 100 µL de tampão PBS e macerados com o auxílio de micropistilos de polipropileno, rotacionando levemente o micropistilo no interior do microtubo. As células em suspensão foram filtradas em *cell strainer* (70 µm), centrifugadas por duas vezes (1.500 rpm, 10 e 7 min, 25ºC) e ressuspendidas em 1 mL de tampão PBS e 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*UltraPure*^{TM} *Low Melting Point*, 0,5% em água ultrapura) a 37ºC, respectivamente. A viabilidade celular dos tratamentos e dos controles foi avaliada em 20 µL da suspensão celular pelo método de exclusão com o corante Azul de Tripano (0,25% em tampão PBS). Lâminas previamente pré-gelatinadas com agarose normal (*UltraPure*^{TM} *Agarose* 1% em tampão PBS) receberam 75 µL da suspensão celular. As lâminas foram cobertas com lamínulas para a distribuição das células por toda a área laminar, e foram mantidas a 4ºC por 10 min. Após o enrijecimento da agarose de baixo ponto de fusão, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10% e Triton X-100 1%, pH 10) por 1,5 h a 4ºC. Após o período, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese preenchida com tampão de eletroforese (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH ≥ 13) e incubadas por 20 min para a desnaturação do DNA. A corrida eletroforética foi realizada na mesma solução, por 20 min a 1 V/cm e 310 mA. Ao terminar, as lâminas foram incubadas em tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 min, e desidratadas em etanol por 5 min.

As lâminas foram coradas com brometo de etídio (20 µg/mL) e examinadas em microscópio de fluorescência (Eclipse E-200, Nikon, Japão) com filtro de excitação de 510-550 nm e filtro de barreira de 570 nm. Os danos no DNA foram quantificados como intensidade de DNA na cauda (*Tail Intensity*), utilizando o software Comet IV (versão 4.3, Perceptive Instruments Ltda). Foram analisados 100 núcleos selecionados aleatoriamente de duas lâminas por tratamento.

3.4.5 Análises estatísticas

Após verificar a distribuição e variância dos dados (normalidade e homocedasticidade) com os testes de Shapiro-Wilk e Barlett, respectivamente, foi aplicada One-way ANOVA seguida do teste de Dunnett (nível de significância de 5%) para verificar diferenças

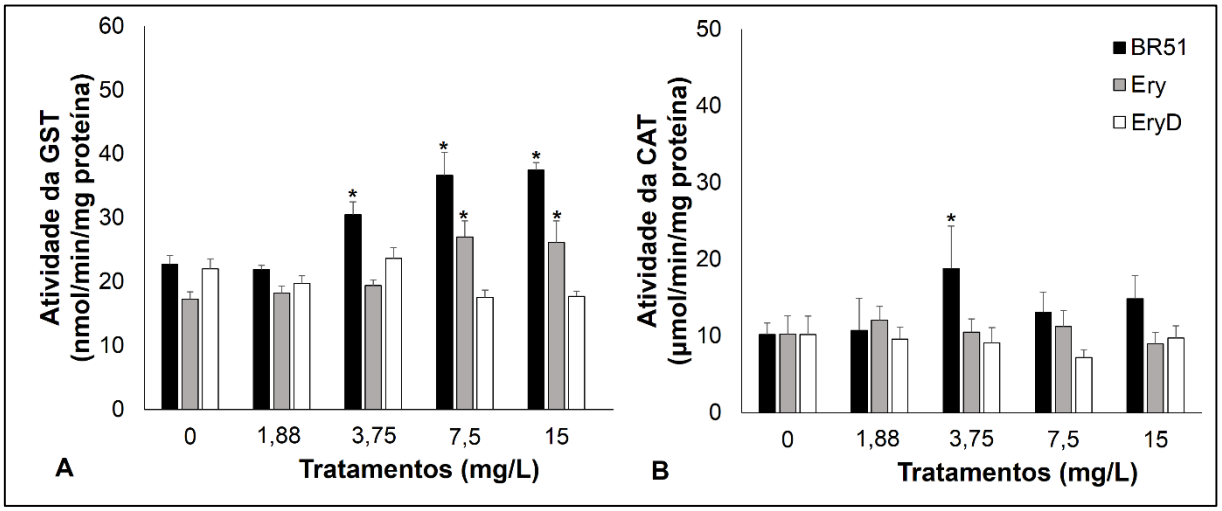
significativas entre as médias dos tratamentos e seus respectivos controles negativos, utilizando o software Sigma Plot 12.5 (SysStat, San Jose, California, USA). No caso da normalidade e/ou homocedasticidade falhar, os dados foram transformados (log10) para estabilizar as variâncias. Os valores de Concentração de Efeito Observado (CEO) também foram definidos.

3.5 Resultados

3.5.1 Enzimas antioxidantes e de detoxicação

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 4. A atividade da GST aumentou significativamente em embriões de zebrafish expostos ao BR51 (CEO=3,75 mg/L) e ao Ery (CEO=7,5 mg/L) em 34% e 56%, respectivamente (Figura 23A, Tabela 4). Por outro lado, o EryD não alterou a atividade da GST dos embriões comparados ao controle (Figura 23A, Tabela 4). O BR51 também aumentou significativamente a atividade da CAT em 88% nos embriões de zebrafish (CEO=3,75 mg/L) comparados aos controles (Figura 23B, Tabela 4). Por outro lado, o Ery e o EryD não alteraram a atividade da CAT (Figura 23B, Tabela 4).

Figura 23. Níveis da atividade da (A) GST e (B) CAT em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle.



Fonte: adaptado de Abe et al. (2017b). Copyright 2017 Taylor & Francis.

Tabela 4. Valores das CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) (mg/L) para zebrafish com 96 hpf.

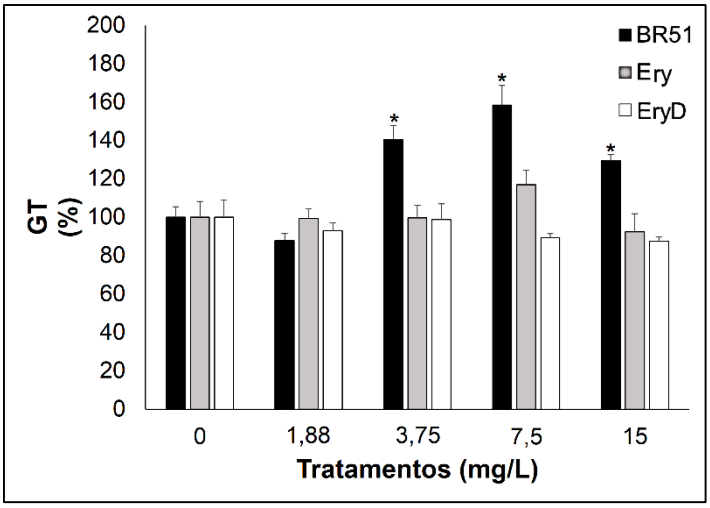
Parâmetro	CEO (mg/L)			ANOVA		
	BR51	Ery	EryD	BR51	Ery	EryD
GST	3,75	7,5	–	$F_{4;30}$=12,8; p<0,001	$F_{4;28}$=4,83; p=0,004	$F_{4;30}$=3,91; p=0,077
CAT	3,75	–	–	$F_{4;30}$=4,19; p=0,009	$F_{4;25}$=0,15; p=0,962	$F_{4;30}$=0,94; p=0,455
GT	3,75	–	–	$F_{4;29}$=5,95; p=0,001	$F_{4;30}$=1,41; p=0,254	$F_{4;29}$=0,73; p=0,579
LPO	7,5	7,5	–	$F_{4;28}$=4,54; p=0,006	$F_{4;30}$=7,98; p<0,001	$F_{4;29}$=0,13; p=0,969
Ensaio do cometa	–	–	–	$F_{4;10}$=1,70; p=0,230	$F_{4;10}$=0,43; p=0,784	$F_{4;10}$=0,16; p=0,953

–nenhum efeito significativo; hpf: horas pós-fertilização. GST: glutationa S-transferase, CAT: catalase, GT: glutationa total, LPO: peroxidação lipídica. Adaptado de Abe et al. (2017b). Copyright 2017 Taylor & Francis.

3.5.2 Níveis de antioxidante não-enzimático

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 4. Os níveis de GT (GSH + GSSG) aumentaram significativamente em embriões de zebrafish expostos ao BR51 em 58% (CEO=3,75 mg/L) (Figura 24, Tabela 4). Entretanto, o Ery e o EryD não alteraram os níveis de GT em embriões de zebrafish comparados aos controles (Figura 24, Tabela 4).

Figura 24. Níveis da glutationa total (GT) em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle.

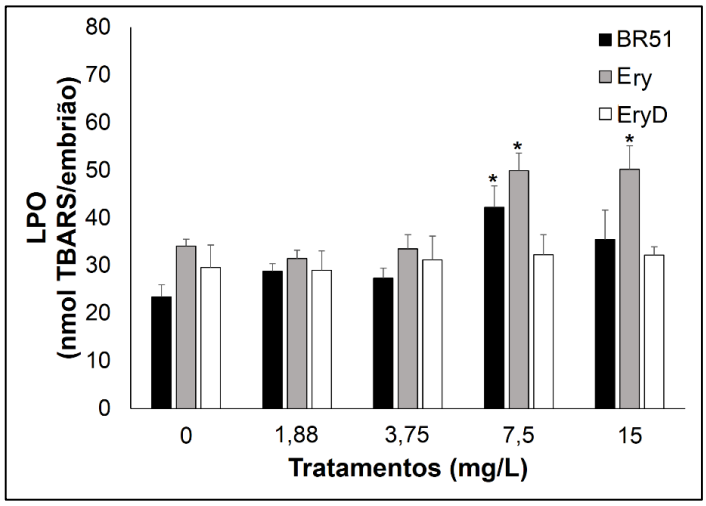


Fonte: adaptado de Abe et al. (2017b). Copyright 2017 Taylor & Francis.

3.5.3 Peroxidação lipídica (LPO)

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 4. O BR51 aumentou significativamente os níveis de LPO em 80% nos embriões de zebrafish expostos a 7,5 mg/L, entretanto embriões expostos a 15 mg/L não foram alterados (Figura 25, Tabela 4). Por outro lado, o Ery aumentou significativamente os níveis de LPO em aproximadamente 46% nos embriões expostos a partir de 7,5 mg/L. Em contraste, o EryD não alterou o parâmetro analisado comparado ao controle (Figura 25, Tabela 4).

Figura 25. Níveis da peroxidação lipídica (LPO) em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle.

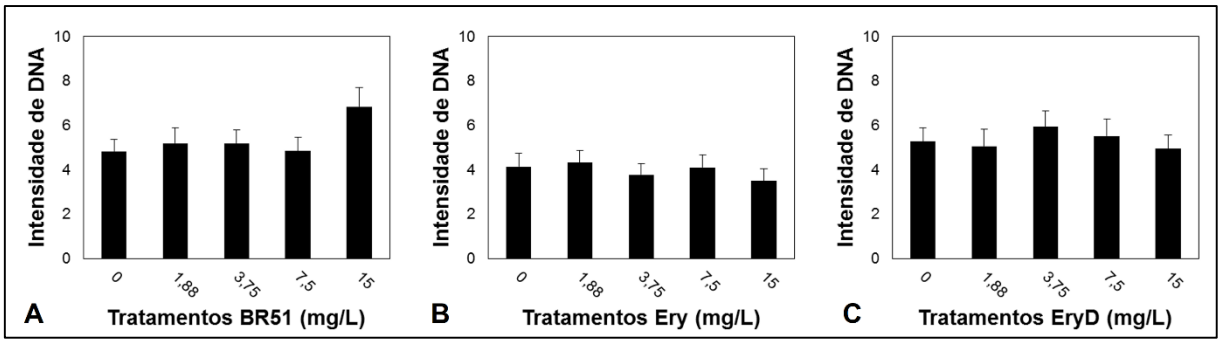


Fonte: adaptado de Abe et al. (2017b). Copyright 2017 Taylor & Francis.

3.5.4 Genotoxicidade

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 4. O BR51, Ery e EryD não induziram efeitos genotóxicos significativos em todos os tratamentos realizados, comparados aos respectivos controles (Figura 26).

Figura 26. Comparação das médias de intensidade de DNA na cauda (*Tail intensity*) pelo ensaio do cometa realizado em embriões de zebra com 96 hpf expostos ao (A) Basic Red 51 (BR51); (B) eritrostominona (Ery) e (C) eritrostominona degradado (EryD).



3.6 Discussão

Os efeitos adversos de corantes azo foram demonstrados por diversos autores em ensaios *in vitro* utilizando células de mamíferos. O BR51, por exemplo, induz efeitos mutagênicos em células humanas associados ao aumento na formação de eletrófilos altamente reativos (SCCS, 2011) e e na produção intracelular de EROs (ZANONI et al., 2014). Entretanto, estudos sobre o estresse oxidativo induzido em organismos aquáticos não-alvos são escassos ou inexistentes. Nossos estudos mostraram que os corantes BR51 e Ery alteram os sistemas de detoxificação e antioxidante de embriões de zebrafish. Ambos alteraram o equilíbrio oxidativo, entretanto não induziram danos genotóxicos.

Doses subletais do BR51 e Ery aumentaram a atividade da GST em embriões de zebrafish, uma importante enzima de fase II do metabolismo de xenobióticos, fundamental para o sistema de detoxificação e para outros mecanismos antioxidantes pela catalisação de reações da GSH (VAN DER OOST et al., 2003; TRACHOOTHAM et al., 2008). Estes resultados apontam a atividade pró-oxidante do BR51 e Ery, e indicam que embriões de zebrafish já possuem capacidade metabólica, apesar das evidências de baixa sensibilidade de embriões de zebrafish a compostos que requerem metabolização para bioativação (KNOBEL et al., 2012). O BR51 também aumentou a atividade da CAT, aumentando a capacidade dos organismos em decompor o H_2O_2 possivelmente formado durante a dismutação do superóxido (TURRENS, 1997), e aumentou nos níveis de glutationa, que desempenha um papel crítico na detoxificação das EROs como antioxidantes ou como substrato para outras enzimas antioxidantes. Os maiores níveis de glutationa são relacionados à superprodução de GSH, ciclicamente oxidada a GSSG e reduzida a GSH novamente (VAN DER OOST et al., 2003).

Diversos outros corantes azo induzem danos oxidativos em diferentes organismos não-alvos. O corante azo Disperse Red 1, por exemplo, elevou as defesas antioxidantes de cnidários de água doce *Hydra attenuata* (JONG et al., 2016), e o Acid Black induziu estresse oxidativo em peixes de água doce *Labeo rohita* pelo aumento das atividades da GST e CAT (KAUR; KAUR, 2015). Zebrafish adultos expostos a efluentes de indústrias têxteis também aumentaram a produção de EROs e diminuíram as atividades da GST e da enzima antioxidante superóxido dismutase, indicativos de danos oxidativos (ZHANG et al., 2012).

Apesar do Ery não aumentar os níveis de glutationa e a atividade antioxidante da CAT nos organismos, ele também exerceu atividade pró-oxidante. Os efeitos pro-oxidantes e a ausência de alterações na glutationa e na CAT poderiam ser atribuídos à efeitos do corante que possam ter dificultando a ativação do sistema antioxidante. As quinonas são relacionadas tanto ao aumento e quanto à diminuição na geração de EROs (OHSHIMA et al., 1998). Corantes fenólicos de fontes naturais podem atuar na proteção ao estresse oxidativo (KITTAKOOP et al., 1999; ANANTHARAMAN et al., 2014; SILVA et al., 2014; BALDIN et al., 2016), ou exercer ambos os efeitos pró-oxidantes e antioxidantes, evidenciado pela produção excessiva de EROs e indução das atividades antioxidantes (LAUGHTON et al., 1989; OHSHIMA et al. 1998; LAMBERT; ELIAS, 2010). A exata relação entre os efeitos pró-oxidantes do Ery em embriões de zebrafish e uma possível atividade de proteção ao estresse oxidativo requer outros estudos que elucidem os mecanismos de atuação deste composto.

Os danos oxidativos induzidos pelo BR51 e Ery em embriões de zebrafish foram relacionados aos elevados teores de peroxidação lipídica observados nos embriões expostos aos corantes. Todavia, os danos oxidativos não foram associados à formação de adutos de DNA. Os resultados mostraram que ambos os corantes afetaram o equilíbrio oxidativo e induziram danos na membrana fosfolipídica, associados à perda da permeabilidade e integridade das membranas (VALAVANIDIS et al., 2006). Entretanto, na concentração mais elevada do BR51 houve uma redução na peroxidação lipídica, o que também pode ser devido aos efeitos tóxicos do corante nessa dose ou talvez ao uso de uma via antioxidante alternativa, como as SODs, diminuindo a toxicidade dose-dependente das EROs, não sendo possível compreender se efeito se trata de um efeito tóxico do BR51 ou de recuperação dos organismos.

Em contraste com os efeitos pró-oxidantes induzidos pelo BR51 e Ery em embriões de zebrafish, o produto fotodegradado EryD não induziu qualquer alteração nos biomarcadores de desintoxicação e antioxidantes, assim como na peroxidação lipídica, nas condições testadas.

Estes resultados mostraram que a exposição do Ery à luz formou um composto não prejudicial aos embriões e complementa nossos estudos prévios sobre a inativação do potencial do Ery em induzir efeitos deletérios no desenvolvimento e comportamento de zebrafish após a fotodegradação (ABE et al., 2017a, apresentado no Capítulo 2). Conforme reportado anteriormente, o BR51 não se degrada após a exposição à luz, enquanto que o Ery é facilmente fotodegradável (ABE et al., 2017a, apresentado no Capítulo 2). Sabe-se que os corantes azo têm alta persistência devido à sua elevada estabilidade, e os tratamentos de efluentes contendo corantes azo são baseados em métodos laboriosos, tais como fotoeletrocatalíticos, adsorventes e processos de fenton-coagulação (SHARMA et al., 2011; FRAGA et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Assim, a degradação do Ery por um método econômico e viável de tratamento é um importante resultado e mostra um método eficiente que decompõe o Ery em um composto não prejudicial. Do ponto de vista ecológico, o tratamento eficiente de efluentes contendo este corante em compostos não prejudiciais diminui o risco de intoxicação ambiental.

3.7 Conclusões

Os biomarcadores utilizados no presente estudo foram eficazes para apontar os efeitos de estresse oxidativo dos corantes nos estágios iniciais de vida do zebrafish. Em síntese, o BR51 e Ery são corantes pró-oxidantes para embriões de zebrafish. Ambos aumentam a atividade da enzima GST da fase II do metabolismo, essencial para a detoxificação de EROs e reações de conjugação da glutationa (GSH). O BR51 também eleva a atividade da enzima antioxidante CAT e os níveis da glutationa (GSH + GSSG), relacionada à conjugação de EROs ou eletrófilos para diminuir os danos oxidativos. Entretanto, ambos os corantes induzem a peroxidação fosfolipídica, o que evidencia a condição de estresse oxidativo dos embriões. Por outro lado, quando o Ery é fotodegradado, ele perde o potencial pró-oxidante da estrutura química original e torna-se não prejudicial aos embriões. Por fim, o Ery oferece uma nova possibilidade como corante *eco-friendly* para aplicação industrial em alternativa aos sintéticos, destacado pela redução da toxicidade por fotodegradação facilmente realizada, com as vantagens de facilidade e baixo custo quanto ao tratamento de efluentes industriais.

ANEXO 1

JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH, PART A
https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1371091

Taylor & Francis

Check for updates

Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish

Flavia R Abe[a], Carlos Gravato[b], Amadeu M. V. M. Soares[b], and Danielle P de Oliveira[a]

[a]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil;; [b]Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, Aveiro, Portugal

ABSTRACT

Zebrafish early life stages were found to be sensitive to several synthetic dyes widely used in industries. However, as environmental concentrations of such contaminants are often at sublethal levels, more sensitive methods are required to determine early-warning adverse consequences. The aim of this study was to utilize a multibiomarker approach to examine underlying oxidative stress mechanisms triggered by sublethal concentrations of synthetic azo dye Basic Red 51 (BR51), the natural dye erythrostominone (ERY), and its light-degraded product using zebrafish embryos. Biochemical biomarkers included parameters of detoxifica- tion and markers of antioxidant system, as well as oxidative damage. Results showed pro- oxidant mechanisms attributed to BR51 and ERY as evidenced by increased glutathione S-transferase (GST) activity, a phase II detoxification enzyme related to reactive oxygen species detoxification. BR51 also elevated total glutathione (GSH+GSSG) levels and catalase activity. However, both dyes induced oxidative damage as evidenced by elevated lipid peroxidation content. In contrast, when the natural dye was photodegraded, no marked effects were observed for all biomarkers assessed. Data indicate that such dyes are pro-oxidants at sublethal concentrations, predominantly involving GSH and/or related enzymes pathway.

ARTICLE HISTORY
Received date 06 June 2017
Revised date 21 August 2017
Accepted date 21 August 2017

Introduction

Zebrafish (*Danio rerio*) early life stages have been used in ecotoxicology as alternative models for conventional acute fish toxicity assays (Carlsson et al. 2014; Lyche et al. 2016). Early life stages of fish feed endogenously via yolk supply and thus are not subjected to regulations for animal experimentation (EC Directive 2010/63/EU). Further, zebrafish exhibit a well-characterized early development (Braunbeck et al. 2005; Embry et al. 2010; Lammer et al. 2009; Scholz et al. 2008; Strahle et al. 2012), affirming this species as a sensitive organism, as well as reliably reflecting acute fish test results (Braunbeck et al. 2005; Knöbel et al. 2012). Previously, many studies used zebrafish early life stages to examine the toxicity of pollutants and emergent contaminants (Andrade et al. 2016; Cunha et al. 2017; Henriques et al. 2015; Liu et al. 2007; Lyche et al. 2016; Nourizadeh-Lillabadi et al. 2009; Oliveira et al. 2016; Rocha et al. 2017; Zhu et al. 2012).

The aquatic environment is the major target of contaminants from industrial effluents. It is known that textile industries release approximately 15–50% of the total amount of dyes used during manufacturing into the aquatic environment (Nojavan et al. 2013), and concentrations may be detected from traces (µg/L) up to 500 mg/L, depending upon the dyes and processes used (Nojavan et al. 2013; O'Neill et al. 1999). Thus, hazardous wastes from industries, including textile, cosmetic, pharmaceutical, and food, are regulated by the European Union (EU), which established restriction of chemicals released into aquatic ecosystems (EC1907/2006) and penalties to infringements on disposal of dangerous wastes (EU Directive 2000/532/EC; EU Directive 2008/98/ EC; EU Directive 2014/955/EC). However, several carcinogenic and mutagenic dyes are still used by industries (Chequer et al. 2011; Leme et al. 2015; Reid et al. 1984; Rocha et al. 2017). The synthetic azo dye Basic Red 51 (BR51) is currently applied in

CONTACT Flavia R Abe frabe@usp.br School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
All authors contributed equally.
Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/uteh.
© 2017 Taylor & Francis

Capítulo

04

ZEBRAFISH:
neurotoxicidade e alocação de energia

Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: cellular energy allocation and neurotoxicity

Flavia R. Abe,[1,2] Amadeu M.V.M. Soares,[2] Danielle P. de Oliveira,[1] Carlos Gravato,[2]

[1]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [2]Department of Biology and Centre of Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

*corresponding author: frabe@usp.br

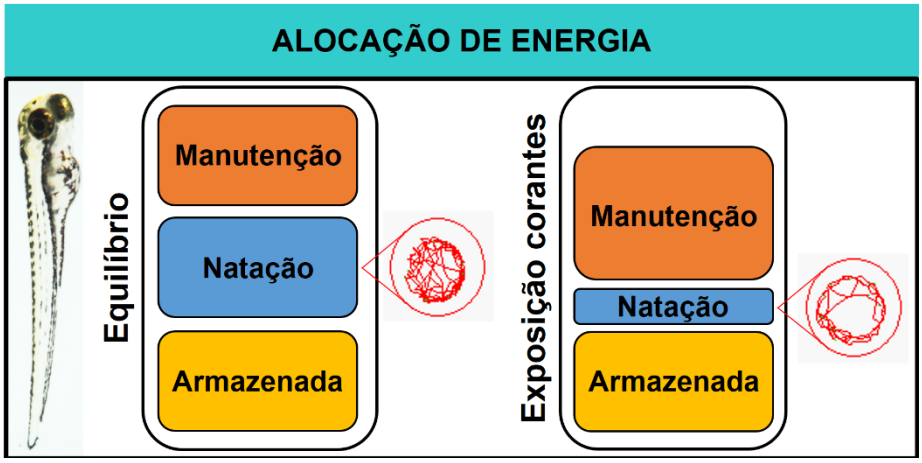
Submetido ao *Environmental Pollution*.

4.1 Resumo

Os corantes são amplamente distribuídos por todo o mundo, no entanto, suas respectivas toxicidades permanecem mal compreendidas, o que gera preocupações como contaminantes do ambiente aquático por efluentes urbanos e industriais. O presente trabalho foi delineado para avaliar os efeitos tóxicos induzidos pelo corante sintético azo Basic Red 51 (BR51) e pelo corante natural eritrostominona (Ery) nos estágios iniciais de vida do zebrafish (*Danio rerio*) em diferentes níveis de organização biológica, ou seja, estudar como mudanças nos parâmetros bioquímicos de importantes funções fisiológicas (neurotransmissão e alocação de energia celular) estão associadas a alterações no comportamento (atividade de natação). Também foram avaliados os efeitos tóxicos do Ery após a sua fotodegradação, que resulta em um produto incolor (EryD). Os resultados mostraram que os embriões de zebrafish expostos a BR51 e Ery consumiram menos energia, apesar dos níveis inalterados de energia disponível (carboidratos, lipídios e proteínas). Portanto, a alocação de energia celular aumentou significativamente. Além disso, o Ery também diminuiu a atividade da enzima acetilcolinesterase. Apesar disso, as larvas de zebrafish expostas a ambos os corantes permaneceram menos ativas. Em contraste, o EryD não alterou nenhum dos parâmetros analisados. Estes resultados indicam uma associação entre um menor consumo de energia e a diminuição da atividade de natação como resultado de uma condição de estresse, independentemente da neurotoxicidade dos corantes. A degradação do Ery pela luz mostrou-se eficiente para impedir os efeitos tóxicos anteriormente observados, sugerindo um tratamento alternativo barato, rápido e fácil de efluentes contendo este corante natural.[3]

Palavras-chaves: Basic Red 51, eritrostominona, energia disponível, energia consumida.

Resumo gráfico



Fonte: Adaptado de Abe et al. (2017c). Copyright 2017 Elsevier Ltd.

[3] **Os dados deste capítulo foram submetidos ao periódico *Environmental Pollution*, e está em fase final de correção (Anexo 1).** Assim, esperamos em breve ter o aceite para publicação. Abe, F.R.; Soares, A.M.V.M.; Oliveira, D.P.; Gravato, C. (2017c) Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: cellular energy allocation and neurotoxicity.

4.2 Abstract

Dyes are widely distributed worldwide, and can be found in wastewaters resulting from industrial or urban effluents. They are of particular concern as contaminants of the aquatic environment, since their toxicity remain poorly understood. Thus, the current study was designed to assess the effects induced by the synthetic azo dye Basic Red 51 (BR51) and by the natural naphthoquinone dye erythrostominone (Ery) on zebrafish early life stages (*Danio rerio*) at different biological organization levels, i.e., studying how changes in biochemical parameters of important physiological functions (neurotransmission and cellular energy allocation) may be associated with behavior alterations (swimming activity). This approach was also used to assess the effects of Ery after its photodegradation resulting in a colorless product(s) (EryD). Results showed that zebrafish embryos exposed to BR51 and Ery consumed less energy, despite the unaltered levels of available energy (carbohydrates, lipids and proteins). Hence, cellular energy allocation was significantly increased. On the other hand, only Ery decreased the acetylcholinesterase activity. Despite that, zebrafish larvae exposed to both dyes were less active. In contrast, EryD did not affect any parameter measured. These results indicate an association between a decrease consumption of energy and decrease swimming activity resulting from an environmental stress condition. Degradation of Ery by light prevented all toxic effects previously observed, suggesting a cheap, fast and easy alternative treatment of effluents containing this natural dye.

4.3 Introdução

As concentrações de corantes no ambiente são muitas vezes encontradas em níveis subletais, e o desenvolvimento de ferramentas mais sensíveis é essencial para fornecer respostas mais próximas de um cenário realista. Os biomarcadores de balanço energético são importantes indicadores de respostas relacionadas à estressores químicos, uma vez que os estressores induzem o sistema de detoxificação, de elevado custo energético (SOKOLOVA et al., 2012). Consequentemente, a alocação de energia para outros processos fisiológicos pode ser diminuída ou comprometida (DE COEN; JANSSEN 1997; SMOLDERS et al., 2003; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE 2003; SMOLDERS et al., 2004; LAM 2009).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do BR51 e Ery, e de seu produto de fotodegradação (EryD), no balanço energético de embriões de zebrafish (*Danio rerio*). Para isso, foram avaliadas a energia disponível (Ea), pela determinação dos lipídios, carboidratos e proteínas totais, e a energia consumida (Ec), pela atividade do sistema de transporte de elétrons mitocondrial (ETS). O metabolismo anaeróbico foi determinado pela atividade da lactato desidrogenase (LDH). Também foram determinadas a atividade colinérgica pela atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), e o comportamento dos organismos, monitorado durante 50 min para avaliar a atividade de natação.

4.4 Materiais e Métodos

4.4.1 Corantes em estudo

O corante sintético BR51 (2-(((4-dimethyllamino) phenyl) azo)-1,3-dimethyl-1H-imidazolium chloride, CAS n.º 77061-58-6, MW: 279,6 g/mol, pureza 99%) (Figura 1A) foi adquirido da LCW Import and Export Ltd (São Paulo, Brasil). O corante natural Ery (CAS n.º 26153-04-8, MW: 348,08 g/mol, pureza 85-92%) foi extraído de fungo endofítico cepa LC01-A (espécie em fase de identificação, cedida pela CCMA, EMBRAPA, Brasil), purificado e caracterizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de Química da FFCLRP, USP (Ribeirão Preto, Brasil).

Soluções estoques do BR51 foram diretamente preparadas em água de osmose reversa, e diluídas na mesma água imediatamente antes do início dos testes. Soluções estoques do Ery foram preparadas em dimetil sulfoxido (DMSO) e diluídas em água de osmose reversa (DMSO 0,01%, v/v) imediatamente antes do início dos testes. Soluções do Ery degradado (EryD) foram preparadas previamente a partir de soluções testes do Ery (DMSO 0,01% em água de osmose reversa, v/v), expostas a luz branca constante (250 lx, 36W) durante 7 dias, e imediatamente utilizadas nos ensaios. Água de osmose reversa e DMSO 0,01% em água de osmose reversa (v/v) foram usados como controles negativos, e 3,4-dicloroanilina (DCA 2 mg/L) como controle positivo.

4.4.2 Manutenção de zebrafish e obtenção dos ovos

Os ensaios foram realizados no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal). Culturas de zebrafish (linhagem AB) do biotério local foram mantidas em aquários de 3,5 L com densidade de 3-6 adultos/L, em sistema de fluxo contínuo equipado com filtro de carbono (ZebTec, Tecniplast, Itália) (Figura 15A), a pH 7,5 ± 0,5, temperatura de 26 ± 1ºC, oxigênio dissolvido a 95% de saturação, condutividade de 750 ± 50 µS/cm, e fotoperíodo de 16:8 h. Os organismos foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (ZM400 Granular).

Para a obtenção dos ovos, fêmeas e machos adultos (1:2) foram alocados separadamente em aquário contendo divisória transparente vazada, permitindo a troca de água entre os compartimentos (Figura 15B). Com o início do fotoperíodo na manhã seguinte, a divisória foi

retirada e os peixes desovaram por 1 h. Decorrido o tempo, os ovos foram coletados e lavados em água autoclavada. Os ovos fertilizados em período de clivagem (4-64 células) (Figura 15C) foram selecionados em estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) e utilizados nos ensaios subsequentes, aleatoriamente designados aos tratamentos. Os embriões e larvas não receberam alimentação exógena durante os ensaios, uma vez que até 144 horas pós fertilização (hpf) ainda se alimentam do vitelo.

4.4.3 Biomarcadores Bioquímicos

Os ovos selecionados foram distribuídos em placas de Petri contendo 50 mL de solução teste, sendo 25 ovos/placa e 6 placas/tratamento. Foram realizados os tratamentos dos controles negativos, controle positivo e 4 concentrações subletais do Ery e EryD e do BR51 (1,87; 3,75; 7,5 e 15 mg/L) (Figura 22). As placas foram mantidas a 26 ± 1ºC em sistema estático e no escuro para evitar a degradação dos corantes. Ao atingirem 96 hpf, 7 grupos contendo 19 embriões cada foram coletados por tratamento, totalizando 133 embriões por tratamento (n=7×19 embriões/tratamento). Durante a coleta, os grupos de embriões foram mantidos em microtubos de 2 mL submersos em gelo e imediatamente armazenados a -80ºC até as análises.

No momento das análises, as amostras foram homogeneizadas em 1600 µL de água ultrapura, utilizando homogeneizador ultra-sônico (Ystral GmbH D-7801 Dottingen, Alemanha). Parte do homogenato foi aliquotada em microtubos com 150 µL de tampão de homogeneização (Tris-(hidroximetil)-aminometano, polivinilpirrolidona, sulfato de magnésio, Triton X-100, pH 8,5) e centrifugada (1.000 × *g*, 10 min, 4ºC) (Eppendorf 5210F, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para análises de sistema transportador de elétrons (ETS). Parte do homogenato também foi aliquotada em microtubos para lipídios, carboidratos e proteínas de reserva, e o restante da amostra foi centrifugada (10.000 × *g*, 20 min, 4ºC) (Eppendorf 5210F, Alemanha) para isolar a fração pós-mitocondrial, e aliquotada em microtubos para as análises de AChE, LDH e determinação de proteínas. Todas as análises bioquímicas de cada repetição foram determinadas em quadruplicatas a 25ºC em leitor de microplacas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, EUA).

4.4.3.1 Energia disponível (Ed)

Para a quantificação de lipídios, o homogenato foi adicionado a clorofórmio ($CHCl_3$ concentrado), metanol (CH_3OH concentrado) e água ultrapura, e centrifugado (1.000 × *g*, 5 min, 25ºC) (Eppendorf 5210F, Alemanha). A fase orgânica foi transferida para um novo microtubo, tratada com H_2SO_4 concentrado e incubada por 15 min a 200ºC, seguida do resfriamento e da leitura espectrofotométrica a 375 nm, usando tripalmitina como padrão.

Para a quantificação dos carboidratos e proteínas totais, o homogenato foi pré-tratado com ácido tricloroacético (TCA) 15%, incubado por 10 min a -20ºC, e centrifugado (1.000 × *g*, 10 min, 4ºC) (Eppendorf 5210F, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio de vidro para a determinação dos carboidratos e o *pellet* foi ressuspendido em NaOH 1N, incubado por 30 min a 60ºC, e neutralizado com HCl 1,67 M para a determinação das proteínas. No homogenato dos carboidratos totais, foram adicionados fenol 5% e H_2SO_4 concentrado, seguido de incubação por 30 min a 25ºC, e determinação da absorbância a 492 nm, usando glucose como padrão. No homogenato das proteínas totais, foi adicionado o reagente de Bradford (método de Bradford), seguido de incubação por 30 min a 25ºC, e determinação da absorbância a 595 nm, utilizando γ-globulina bovina como padrão.

As reversas energéticas foram estimadas pela soma dos conteúdos totais de lipídios, carboidratos e proteínas, transformando-os em equivalentes energéticos por entalpia de combustão (39,5 kJ/g para lipídios, 17,5 kJ/g para carboidratos e 24 kJ/g para proteínas), de acordo com o método descrito por De Coen e Janssen (1997). Os resultados foram expressos em mJ/embrião.

4.4.3.2 Energia consumida (Ec)

A atividade do ETS foi determinada de acordo com o método descrito por De Coen e Janssen (1997), monitorando as atividades das macroenzimas do ETS. Foi adicionado ao homogenato tampão de homogeneização, solução tamponada do substrato β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'-fosfato reduzida (NADPH) (Tris, Triton X-100, pH 8,5), e solução de cloreto de iodonitrotetrazolio (INT) em água ultrapura. A atividade foi monitorada a 490 nm durante 3 min, utilizando o coeficiente de extinção molar de $1,59 \times 10^4$ M^{-1} cm^{-1}.

A taxa de oxigênio celular consumido foi determinada usando a relação de estequiometria (2 µmol INT-formazan formado para 1 µmol oxigênio consumido). A quantidade de oxigênio consumido foi calculada pela equação de Lambert–Beer: $A = \varepsilon \times l \times c$ (A=absorbância; ε para INT-formazan=15.900/M•cm; l=0,9 cm; c=oxigênio consumido em M), e transformado em equivalentes energéticos usando os equivalentes de oxientalpia para as misturas médias de lipídio, carboidratos e proteínas (480 kJ/mol O_2). A atividade foi expressa em mJ/org/hora.

4.4.3.3 Alocação de energia celular (AEC)

A alocação de energia celular (AEC) consiste da relação entre as reservas energéticas e consumo de energia, e foi calculada de acordo com o método descrito por Verslycke et al. (2003), utilizando a fórmula: AEC = Ed / Ec. Os valores finais de AEC foram expressos em mJ/org.

4.4.3.4 Lactato desidrogenase (LDH - EC 1.1.1.27)

A atividade da LDH foi determinada de acordo com o método descrito por Vassault (1983) adaptado para microplacas por Diamantino et al. (2001), medindo o declínio na absorbância devido à oxidação do NADH pelo consumo de piruvato. O homogenato foi adicionado ao tampão de reação Tris/NaCl/NADH (pH 7,2; 25ºC), seguido da adição do tampão de reação Tris/NaCl/piruvato (pH 7,2; 4ºC). Imediatamente após a adição dos tampões de reação, a atividade foi monitorada continuamente durante 5 min a 340 nm e expressa em nmol/min/mg proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de 6,3 mM^{-1} cm^{-1}.

4.4.3.5 Acetilcolinesterase (AChE - EC 3.1.1.7)

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961) adaptado para microplacas por Frasco e Guilhermino (2002), baseado na velocidade da produção de tiocolina pela hidrólise do substrato acetiltiocolina. O homogenato foi adicionado à solução de reação contendo tampão fosfato-potássio 0,1 M (pH 7,2), solução de acetiltiocolina 0,075 M em água ultrapura, e solução de 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) e

$NaHCO_3$ em tampão fosfato-potássio 0,1 M (pH 7,2). A atividade foi monitorada continuamente durante 5 min a 414 nm e expressa em nmol/min/mg proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de $13,6 \times 10^3$ M^{-1} cm^{-1}.

4.4.3.6 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) adaptado para microplacas por Guilhermino et al. (1996), usando a γ-globulina bovina como padrão. As medidas foram realizadas espectrofotometricamente a 600 nm.

4.4.4 Ensaio de comportamento

O comportamento de zebrafish foi monitorado de acordo com os procedimentos previamente descritos por Macphail et al. (2009), Padilla et al. (2011) e Henriques et al. (2015). Ovos fertilizados foram distribuídos em placas de Petri contendo 50 mL de solução teste, sendo 10 ovos/placa e 3 placas/tratamento. Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e 4 concentrações subletais do Ery, EryD e BR51 (1,88; 3,75; 7,5 e 15 mg/L). As placas foram mantidas a 26 ± 1ºC, em sistema estático e no escuro para evitar a degradação dos corantes. Ao completar 144 hpf, quando as larvas já possuem bexiga natatória inflada, 20 larvas por tratamento foram individualmente transferidas para placas para cultura celular de 96 poços (n=20 larvas/tratamento) contendo 200 µL de solução teste (Figura 17), definindo as dimensões da área experimental em 6,5 mm (diâmetro do poço) × 5,5 mm (altura atingida pela solução teste no poço). O rastreamento da locomoção foi realizado sempre no mesmo período do dia (1 p.m.), utilizando o sistema de rastreamento de vídeo ZebraBox e ZebraLab software (ViewPoint Life Science, Lyon, França).

Os 10 min iniciais de rastreamento foram realizados no escuro como período de aclimatação para minimizar distúrbios causados na transferência das larvas. Decorrido o período, foram gravados 4 ciclos consecutivos de 10 min cada, alternando claro e escuro, sendo utilizado iluminação LED para os ciclos no claro e luz infravermelha para os ciclos no escuro. Foi utilizado fundo transparente com limite de detecção de 25 frames por segundo para a detecção das larvas, e a distância mínima de 0,5 mm foi definida como “inativo” para evitar rastreamento de ruído do sistema. Os dados foram automaticamente amostrados a cada 60

segundos (período de integração), com a obtenção do número de eventos que as larvas permaneceram ativas (número de atividades). Ao final do teste, as larvas foram analisadas em estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) para verificar a inflação da bexiga natatória, uma vez que a não inflação pode prejudicar a natação (STRAHLE et al., 2012).

4.4.5 Análises Estatísticas

Após verificar a distribuição e variância dos dados do FET e do ensaio de comportamento de zebrafish (normalidade e homocedasticidade) com os testes de Shapiro-Wilk e Barlett, respectivamente, foi aplicada One-way ANOVA seguida do teste de Dunnett (nível de significância de 5%) para verificar diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e seus respectivos controles negativos, utilizando o software Sigma Plot 12.5 (SysStat, San Jose, California, USA). Os valores de Concentração de Efeito Observado (CEO) também foram definidos.

4.5 Resultados

4.5.1 Energia disponível, energia consumida, alocação de energia celular

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 5. Os resultados mostraram que os lipídios foram a fonte predominante de energia das reservas (88-90%), seguido pelos carboidratos (6-9%) e proteínas (2,5-4,5%). Ambos os corantes BR51 e Ery e o degradado EryD não alteraram significativamente os componentes da Ea, comparados aos respectivos controles (Tabela 5 e Tabela 6). Entretanto, os embriões de zebrafish expostos ao BR51 e ao Ery consumiram significativamente menos energia em concentrações a partir de 7,5 mg/L, comparados aos respectivos controles, enquanto embriões expostos ao EryD não apresentaram alterações significativas (Figura 27A, Tabela 5). Desta forma, diferenças significativas foram encontradas na AEC apenas em embriões expostos ao BR51 e Ery (Figura 27B, Tabela 5).

Tabela 5. Valores das CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) (mg/L) para o balanço energético e biomarcadores LDH e AChE de zebrafish com 96 hpf.

Parâmetro	CEO (mg/L)			ANOVA		
	BR51	Ery	EryD	BR51	Ery	EryD
Ed	–	–	–	$F_{4;25}$=0,71; p=0,591	$F_{4;29}$=1,44; p=0,246	$F_{4;25}$=0,49; p=0,741
Lipídio	–	–	–	$F_{4;30}$=0,74; p=0,574	$F_{4;30}$=1,39; p=0,262	$F_{4;30}$=0,56; p=0,695
Carboidrato	–	–	–	$F_{4;25}$=1,02; p=0,415	$F_{4;26}$=0,42; p=0,790	$F_{4;27}$=0,12; p=0,976
Proteína	–	–	–	$F_{4;29}$=2,63; p=0,055	$F_{4;26}$=0,74; p=0,572	$F_{4;27}$=1,42; p=0,253
Ec	7,5	7,5	–	$F_{4;29}$=3,96; p=0,011	$F_{4;29}$=23,7; p<0,001	$F_{4;29}$=0,75; p=0,564
AEC	7,5	7,5	–	$F_{4;25}$=2,44; p=0,034	$F_{4;29}$=14,4; p<0,001	$F_{4;27}$=0,44; p=0,776
LDH	–	–	–	$F_{4;27}$=3,01; p=0,055	$F_{4;27}$=0,67; p=0,616	$F_{4;29}$=0,62; p=0,655
AChE	–	15	–	$F_{4;30}$=1,15; p=0,351	$F_{4;28}$=8,79; p<0,001	$F_{4;30}$=1,99; p=0,121

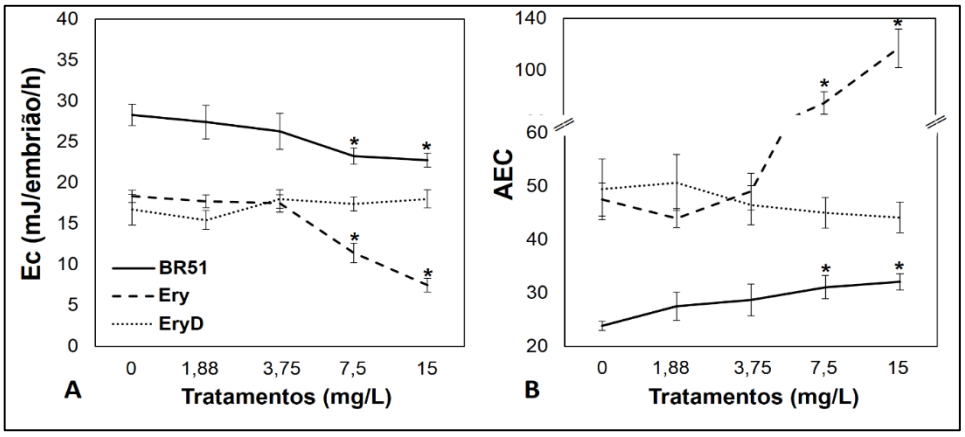
–nenhum efeito significativo; hpf: horas pós-fertilização. Ed: energia disponível, Ec: energia consumida, AEC: alocação de energia celular, LDH: lactato desidrogenase, AChE: acetilcolinesterase.

Tabela 6. Efeitos do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) sobre a energia disponível (Ed) de embriões de zebrafish com 96 hpf. Valores representados por média ± erro padrão (n=7 grupos com 19 embriões cada).

Tratamentos	Frações da Ed (%)			Ed total
	Lipídios	Carboidratos	Proteínas	(mJ/embrião)
BR51				
0	89,8 ± 0,5	6,1 ± 0,4	4,1 ± 0,1	677,6 ± 25,2
1,88	88,6 ± 0,7	7,0 ± 0,6	4,4 ± 0,2	722,1 ± 21,7
3,75	89,8 ± 0,4	6,5 ± 0,5	3,8 ± 0,3	718,8 ± 10,6
7,5	90,4 ± 0,2	5,8 ± 0,3	3,7 ± 0,2	709,3 ± 20,1
15	89,3 ± 1,0	6,9 ± 0,7	3,8 ± 0,3	711,1 ± 10,5
Ery				
0	88,8 ± 0,8	8,5 ± 0,6	2,6 ± 0,5	858,5 ± 19,7
1,88	88,3 ± 0,8	8,2 ± 0,7	3,5 ± 0,2	773,1 ± 18,4
3,75	88,6 ± 0,9	8,7 ± 0,9	2,6 ± 0,2	839,1 ± 31,2
7,5	88,5 ± 1,3	8,4 ± 1,1	3,1 ± 0,3	798,8 ± 32,1
15	89,6 ± 1,2	7,6 ± 1,1	2,9 ± 0,3	806,6 ± 36,0
EryD				
0	89,0 ± 0,7	7,5 ± 0,6	3,5 ± 0,1	764,3 ± 15,4
1,88	88,9 ± 0,8	7,1 ± 0,9	3,9 ± 0,2	766,5 ± 29,6
3,75	89,9 ± 0,3	6,7 ± 0,3	3,4 ± 0,2	803,1 ± 19,2
7,5	89,4 ± 1,1	7,0 ± 1,0	3,5 ± 0,3	758,9 ± 29,9
15	89,1 ± 0,5	6,9 ± 0,6	3,9 ± 0,1	778,2 ± 16,6

Fonte: adaptado de Abe et al. (2017c).

Figura 27. Níveis da (A) energia total consumida (Ec) e (B) alocação de energia celular (AEC) em embriões de zebrafish expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD) durante 96 hpf. Valores representados por média ± erro padrão (n=7 grupos com 19 embriões cada). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle.

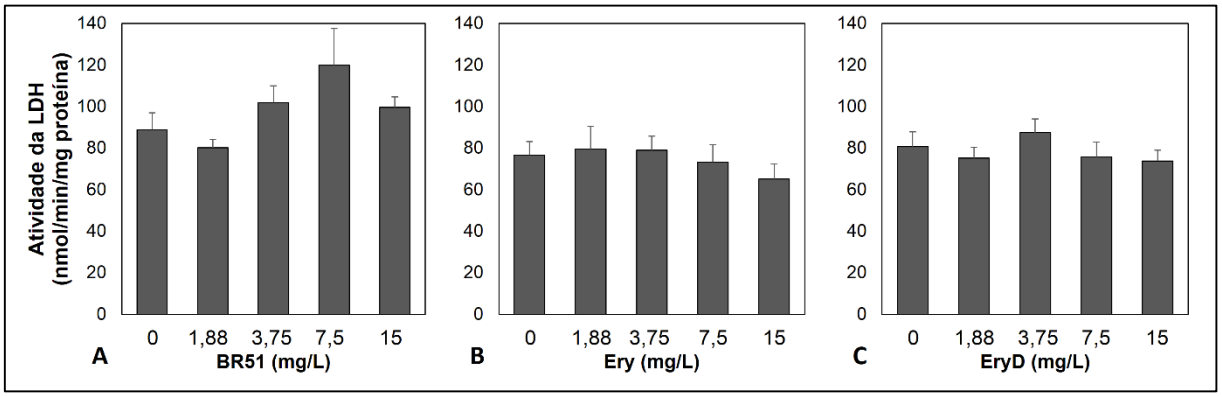


Fonte: adaptado de Abe et al. (2017c).

4.5.2 Lactato desidrogenase (LDH)

Os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 5. Os resultados mostraram que a atividade da LDH não foi significativamente alterada em embriões de zebrafish expostos ao BR51, Ery e EryD, comparados aos respectivos controles (Figura 28, Tabela 5).

Figura 28. Níveis da atividade da LDH em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20).

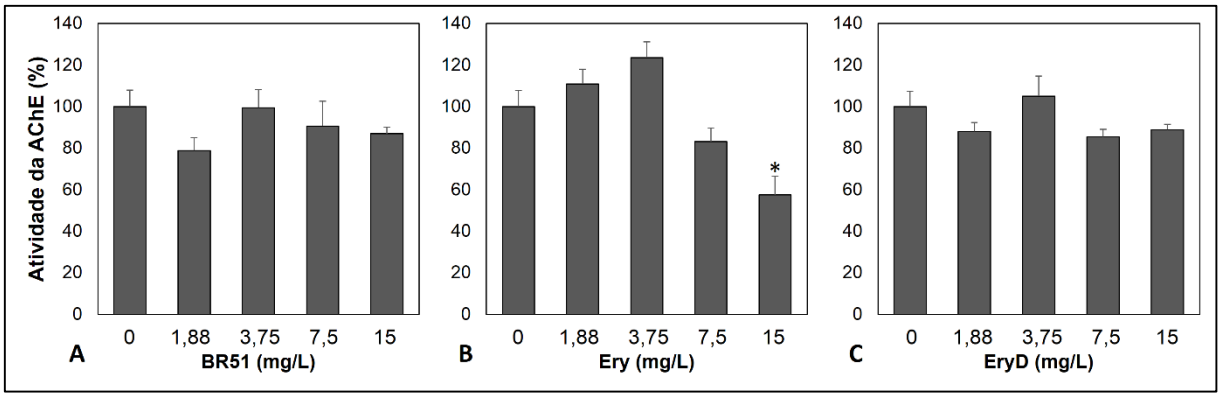


Fonte: adaptado de Abe et al. (2017c).

4.5.3 Acetilcolinesterase (AChE)

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 5. Os resultados mostraram que houve uma diminuição significativa na atividade da AChE em embriões de zebrafish expostos somente a 15 mg/L do Ery. Não houve diferenças significativas em embriões expostos ao BR51 e ao EryD, comparados aos respectivos controles (Figura 29, Tabela 5).

Figura 29. Níveis da atividade da AChE em embriões de zebrafish com 96 hpf expostos ao Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona fotodegradada (EryD). Valores representados por média ± erro padrão (n=20). *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle.



Fonte: adaptado de Abe et al. (2017c).

4.5.4 Atividade locomotora

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para embriões de zebrafish expostos ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 7. As larvas de zebrafish mostraram uma diminuição no padrão de atividades durante os ciclos no escuro comparados aos ciclos no claro. Diferenças significativas nas atividades dos embriões expostos ao BR51 e Ery ocorreram nos dois ciclos de claro, entretanto durante os ciclos do escuro, as diferenças foram estatisticamente mais significativas no segundo ciclo e, portanto, apenas os resultados relacionados aos segundos ciclos de claro e escuro foram apresentados (Figura 30). O BR51 e Ery diminuíram significativamente a atividade locomotora das larvas comparados aos controles. O BR51 diminuiu a atividade das larvas durante os ciclos de claro e escuro (Figura 30A, Tabela 7). Já o Ery diminuiu a atividade das larvas somente durante o ciclo do escuro, sem alterações durante o ciclo do claro (Figura 30B, Tabela 7). Em contraste, as larvas expostas

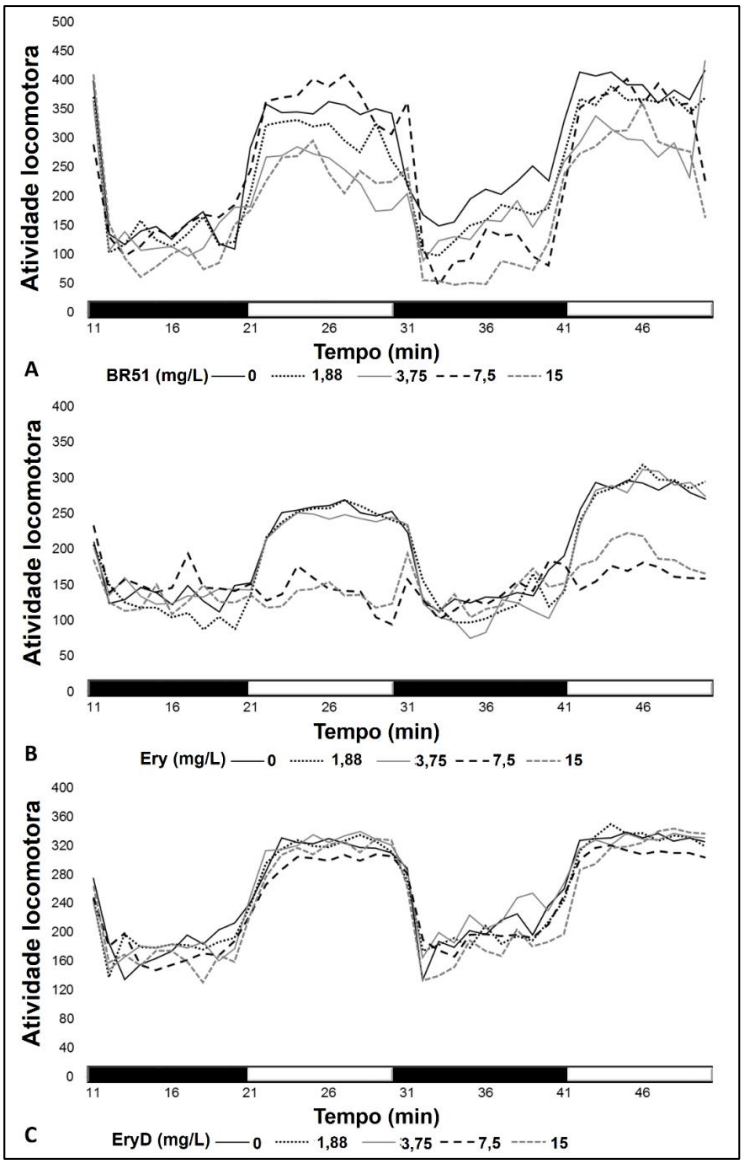
ao EryD não apresentaram alterações na atividade locomotora comparadas ao controle (Figura 30C, Tabela 7).

Tabela 7. Valores das CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) e eritrostominona degradada (EryD) (mg/L) para o comportamento de zebrafish com 144 hpf.

Atividade locomotora	BR51			Ery			EryD	
	CEO	ANOVA		CEO	ANOVA		ANOVA	
Claro	7,5	$F_{(4;45)}$=5,6	p=0,0295	−	$F_{(4;45)}$=0,7	p=0,6033	$F_{(4;45)}$=1,9	p=0,6610
Escuro	3,75	$F_{(4;45)}$=7,7	p=0,0002	7,5	$F_{(4;45)}$=21	p<0,0001	$F_{(4;45)}$=1,0	p=0,4452

−nenhum efeito significativo.

Figura 30. Atividade locomotora de larvas de zebrafish com 144 hpf expostas aos corantes (A) Basic Red 51 (BR51), (B) eritrostominona (Ery) e (C) seu fotodegradado (EryD). Valores representados por média de larvas (n=20) por minuto. Cada ciclo de 10 min está representado por barras pretas (ciclo no escuro) e brancas (ciclo no claro).



Fonte: Adaptado de Abe et al. (2017c).

4.6 Discussão

O uso do balanço energético como indicador de estresse ambiental tem ganhado atenção devido às relações entre contaminantes, alocações energéticas e deficiências fisiológicas que refletem na saúde dos organismos expostos (VERSLYCKE et al., 2003; SMOLDERS et al., 2004; MOOLMAN et al., 2007). Nossos resultados mostraram que ambos os corantes BR51 e Ery diminuíram o consumo energético e a atividade locomotora de embriões de zebrafish.

As principais reservas energéticas de embriões de zebrafish foram os lipídios (cerca de 89%), seguido pelos carboidratos (cerca de 7,5%) e proteínas (cerca de 3,5%). Contrariamente aos embriões, em zebrafish adultos as proteínas representam o maior conteúdo energético, considerando a massa corpórea total (SMOLDERS et al., 2003). Esta divergência entre adultos e os estágios iniciais de vida e se deve à elevada quantidade de lipídios presentes no vitelo dos embriões (FRAHER et al., 2016), que diminui ao longo da nutrição endógena, enquanto a síntese de proteínas aumenta com o crescimento dos organismos (HACHICHO et al., 2015). Dentre as fontes energéticas, os lipídios representam a primeira fonte mobilizada quando organismos são expostos a xenobióticos (DE COEN; JANSSEN, 1997) e, juntamente com os carboidratos, são rapidamente mobilizados para suprimir uma demanda de energia (SMOLDERS et al., 2003), enquanto as proteínas são mobilizadas apenas em condições severas (MCKEE; KNOWLES, 1986). No entanto, o BR51 e Ery não induziram nenhum efeito adverso significativo nas fontes energéticas de embriões de zebrafish. Como previamente discutido por Smolders et al. (2003), o estresse ambiental inicia ajustes compensatórios no metabolismo energético dos organismos para a manutenção da homeostase fisiológica, entretanto os xenobióticos são capazes de alterar as fontes energéticas de zebrafish adultos somente após períodos longos de exposição, assim como de outros organismos aquáticos (SMOLDERS et al., 2004; MOOLMAN et al., 2007). Estes trabalhos mostram que os conteúdos energéticos podem não ser alterados pela exposição aguda, mas após exposições prolongadas.

Em relação ao consumo energético, o BR51 e Ery reduziram o consumo energético de embriões de zebrafish, avaliado pela atividade do sistema transportador de elétrons (ETS) diretamente associado ao consumo de oxigênio (DE COEN; JANSSEN, 1997). Do ponto de vista ecológico, o desequilíbrio energético indica uma condição de estresse ambiental que resulta em supressão das taxas metabólicas, e esta desaceleração metabólica permite que os organismos sobrevivam (SOKOLOVA et al., 2012). No estágio de desaceleração metabólica, algumas funções fisiológicas são comprometidas, sendo esperados prejuízos no crescimento,

reprodução, desenvolvimento e/ou atividade locomotora (MCKEE; KNOWLES, 1986; SMOLDERS et al., 2003). Entretanto, embriões de zebrafish expostos ao BR51 e Ery não apresentaram alterações significativas no crescimento (ABE et al., 2017a, apresentado no Capítulo 2), apesar do menor consumo energético. Este fato levantou a hipótese que outras funções de gasto energético além do crescimento poderiam ser prejudicadas pelos corantes. Visto que as larvas de zebrafish expostas aos corantes apresentaram menor atividade locomotora, a redução no consumo energético induzido pelo BR51 e Ery foi associada a hipoatividade dos organismos. Na estratégia de proteção ao estresse ambiental, os custos energéticos dos organismos são reduzidos para a manutenção basal da homeostase e para a reparação dos danos, o que torna os organismos menos ativos (SOKOLOVA et al., 2012).

Apesar das condições de estresse evidenciadas, os corantes não causaram a mobilização da via anaeróbica em embriões de zebrafish, portanto a via aeróbica de produção de energia foi a principal responsável pelo suprimento energético para a detoxificação, manutenção e atividade locomotora dos organismos.

Entretanto, o Ery também diminuiu significativamente a atividade enzimática da AChE nos embriões, responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (PINHO et al., 2013). Consequentemente, a diminuição da atividade locomotora induzida pelo Ery pode também ter sido acentuada e/ou atribuída aos danos colinérgicos. Diversos estudos mostraram que compostos fenólicos naturais alteram as atividades colinérgicas, como forma de proteção à doenças neurodegenerativas (COSTA et al., 2011; CHANGWONG et al., 2012; PINHO et al., 2013; CESPEDES et al., 2013; PHYU; TANGPONG, 2013). Naftoquinonas de extratos de *Mansonia gagei*, por exemplo, inibem a atividade da AChE (CHANGWONG et al. 2012), enquanto fenólicos de extratos de *Thunbergia laurifólia* aumentam a atividade da AChE como proteção à neurotoxicidade (PHYU; TANGPONG, 2013). Assim, as alterações colinérgicas causadas pelo Ery e suas consequências à saúde humana e ambiental necessitam ser melhor elucidadas.

Em contraste ao BR51 e Ery, o produto de fotodegradação do Ery (EryD) não induziu alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados em zebrafish. Como discutido anteriormente, o EryD também não alterou o desenvolvimento embrionário (ABE et al., 2017a, apresentado no Capítulo 2) e os biomarcadores de estresse oxidativo em embriões de zebrafish (ABE et al., 2017b, apresentado no Capítulo 3). Do ponto de vista ecológico, um tratamento eficiente dos efluentes urbanos e industriais contendo corantes de maneira fácil e econômica

proporciona um ambiente seguro para os organismos aquáticos, em contraste com os corantes azo sintéticos, que não são facilmente degradados e requerem métodos mais elaborados (FRAGA et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

4.7 Conclusão

Nossos resultados destacam a utilidade dos biomarcadores de balanço energético como uma ferramenta importante para compreender a alocação energética dos embriões de zebrafish em condições de estresse. As alterações na alocação de energia celular ocorrem concomitantemente com alterações no comportamento: o corante natural Ery e o sintético BR51 reduzem a energia consumida e comprometem o equilíbrio energético e, portanto, prejudicam a alocação de energia a outros processos biológicos, como para a atividade locomotora. O Ery também diminui a atividade da AChE, o que também pode contribuir para as alteraçoes da atividade locomotora. Por outro lado, após a fotodegradação do Ery, o composto perde completamente sua toxicidade aos embriões de zebrafish nas condições testadas, demonstrando um tratamento fácil e rápido de efluentes contendo o corante que pode ser aplicado em tratamentos de efluentes industriais e urbanos.

ANEXO 1

Letter from Environmental Pollution Editor

Ref: ENVPOL_2017_3266
Title: Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: cellular energy allocation and neurotoxicity Journal: Environmental Pollution

Dear Ms. Abe,

I have completed the review of your manuscript, and a summary of the reviewers' comments is appended below. The reviewers recommend reconsideration of your paper following major revision. I invite you to resubmit your manuscript after addressing all reviewer comments. Note that Reviewer 2 has attached a separate file with comments. Also notice that we have included an "Author's Checklist" to help with your resubmission.

When resubmitting your manuscript, please carefully consider all issues mentioned in the reviewers' comments, outline every change made point by point, and provide suitable rebuttals for any comments not addressed.

To submit your revised manuscript:

- Log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ENVPOL
- Locate your manuscript under the header 'My Submissions that need Revisions' on your 'My Author Tasks' view
- Click on 'Agree to Revise'
- Make the required edits
- Click on 'Complete Submission' to approve

What happens next?

After you approve your submission preview you will receive a notification that the submission is complete. To track the status of your paper throughout the editorial process, log in to Evise® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ENVPOL.

Enrich your article to present your research with maximum impact. This journal supports the following Content Innovations:

- Interactive Plots: Interactive plot viewer providing easy access to the data behind plots. Please prepare a .CSV file with your plot data and test it online here before submitting as supplementary material.

I look forward to receiving your revised manuscript as soon as possible.

Kind regards,

Dr Harmon
Associate Editor
Environmental Pollution

Capítulo

05

DAPHNIA MAGNA:
ciclo de vida, comportamento e consumo de oxigênio

Life history and behavior effects of dyes on *Daphnia magna*

Flavia R. Abe,[1,2] Amadeu M.V.M. Soares,[2] Danielle P. de Oliveira,[1] Carlos Gravato,[2] João L. T. Pestana,[2]

[1]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [2]Department of Biology and Centre of Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal.

*corresponding author: frabe@usp.br

A ser submetido à *Aquatic Toxicology*.

5.1 Resumo

No presente trabalho, objetivamos avaliar os efeitos tóxicos induzidos pelo corante sintético azo Basic Red 51 (BR51) e pelo corante natural eritrostominona (Ery) no microcrustáceo *Daphnia magna*, um organismo-teste padronizado e amplamente utilizado em testes ecotoxicológicos. Foram avaliados os efeitos tóxicos na imobilidade, no consumo de oxigênio e no comportamento dos organismos após exposições agudas, e no ciclo de vida (reprodução) após exposições prolongadas. Também foram avaliados os efeitos tóxicos do Ery após a sua fotodegradação, que resulta em um produto incolor (EryD). Os resultados mostraram que ambos os corantes imobilizaram os microcrustáceos, porém o BR51 induziu efeitos em concentrações cerca de 200 vezes mais elevadas do que o Ery (0,1 e 19,7 mg/L, respectivamente). Os organismos juvenis expostos ao BR51 se locomoveram mais rápido e por distâncias mais longas, entretanto o comportamento permaneceu inalterado e o consumo de oxigênio aumentou ao elevar a concentração. O Ery também elevou o número de atividades dos juvenis. O BR51 e o Ery reduziram o número de neonatos por fêmea adulta na segunda ninhada em concentrações de 0,02 e 2 mg/L, respectivamente, e as fêmeas recuperaram o número de neonatos nas ninhadas posteriores, uma resposta adaptativa após exposições prolongadas. Entretanto, 4 mg/L do Ery foi suficiente para diminuir a taxa intrínseca de crescimento populacional da espécie. Em contraste, o EryD não alterou nenhum dos parâmetros analisados. Estes resultados indicam que os corantes elevam a atividade locomotora de *D. magna*, e o BR51 também aumenta o consumo de oxigênio dos organismos frente aos efeitos tóxicos do corante. Ambos os corantes também alteram a reprodução de *D. magna*, e o Ery reduziu o crescimento populacional. A fotodegradação do Ery indica ser um eficiente método para impedir os efeitos tóxicos anteriormente observados, sugerindo um tratamento alternativo barato, rápido e fácil de efluentes contendo o corante natural.[4]

Palavras-chaves: Basic Red 51, eritrostominona, microcrustáceo.

5.2 Abstract

In the present work, we aimed to evaluate the toxic effects induced by the synthetic dye azo Basic Red 51 (BR51) and by the natural dye erythrostominone (Ery) in the microcrustacean *Daphnia magna*, a standardized test organism widely used in ecotoxicological tests. The toxic effects on immobility, oxygen consumption and behavior of organisms were evaluated after acute exposures, and on the life cycle (reproduction) after prolonged exposure. The photodegraded colorless product from Ery (EryD) was also evaluated. The results showed that both dyes immobilized *D. magna*, but BR51 induced effects at concentrations about 200 fold higher than Ery (0.1 and 19.7 mg/L, respectively). The juvenile exposed to BR51 also moved faster and longer distances, however the behavior remained unchanged and the oxygen consumption increased as the concentration increased. Ery also increased the activities number in the swimming of the juvenile. BR51 and Ery reduced the number of neonates per adult female in the second brood at concentrations of 0.02 and 2 mg/L, respectively, and females recovered the number of neonates in subsequent broods, suggesting an adaptive response after prolonged

[4] **Os dados referentes a este capítulo foram compilados em um manuscrito que está em fase final de redação e será submetido ao periódico *Aquatic Toxicology*.** Abe, F.R.; Pestana, J.L.T.; Gravato, C.; Soares, A.M.V.M.; Oliveira, D.P. Life history and behavior effects of dyes on *Daphnia magna*.

exposures. However, 4 mg/L of Ery was sufficient to decrease the intrinsic rate of population growth of *D. magna*. In contrast, EryD did not change any of the analyzed parameters. These results indicate that the dyes increase the locomotor activity of *D. magna*, and BR51 also increases the oxygen consumption of the organisms. Both dyes also alter *D. magna* reproduction, and Ery reduced population growth. The Ery photodegradation indicates an efficient method to prevent previously observed toxic effects, suggesting an inexpensive, fast and easy alternative to treatment of effluents containing the natural dye.

5.3 Introdução

Devido ao potencial mutagênico dos corantes azo, a crescente atenção à produção e uso de corantes naturais intensificou pesquisas visando a extração de pigmentos de fontes naturais (MONGKHOLRATTANASIT et al. 2010, VELMURUGAN et al. 2010, MIRJALILI et al. 2011, BOONSONG et al. 2012, BORGES et al. 2012, LEITNER et al. 2012, BOGA et al. 2013, PUNRATTANASIN et al. 2013, SILVA et al. 2014), bem como estudos do potencial protetor e terapêutico dos colorantes, tais como atividades antimicrobianas, inseticidas, antitumorais e antioxidantes (KUWAHARA et al. 2009, BISHT et al. 2010, SILVA et al. 2014, AKILANDESWARI and PRADEEP 2015, BALDIN et al. 2016). Portanto, a investigação ecotoxicológica de corantes é de grande importância para obter mais informações sobre a saúde segurança ambiental.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do corante natural eritrostominona (Ery) e do sintético Basic Red 51 (BR51) para o cladoceran *Daphnia magna*, um microcrustáceo de água doce altamente sensível aos contaminantes ambientais (BAE; FREEMAN, 2006). Para isso, foram avaliadas a toxicidade aguda dos corantes e efeitos subletais na história da vida, a taxa de respiração e o comportamento dos organismos.

5.4 Materiais e Métodos

5.4.1 Corantes em estudo

O corante sintético BR51 (2-(((4-dimethyllamino) phenyl) azo)-1,3-dimethyl-1H-imidazolium chloride, CAS n.º 77061-58-6, MW: 279,6 g/mol, pureza 99%) (Figura 1A) foi adquirido da LCW Import and Export Ltd (São Paulo, Brasil). O corante natural Ery (CAS n.º 26153-04-8, MW: 348,08 g/mol, pureza 85-92%) foi extraído de fungo endofítico cepa LC01-A (espécie em fase de identificação, cedida pela CCMA, EMBRAPA, Brasil), purificado e

caracterizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de Química da FFCLRP, USP (Ribeirão Preto, Brasil).

Soluções estoques do BR51 foram diretamente preparadas em água ultrapura, e diluídas em meio de cultivo imediatamente antes do início dos testes. Soluções estoques do Ery foram preparadas em dimetil sulfoxido (DMSO) e diluídas em meio de cultivo (DMSO 0,01%, v/v) imediatamente antes do início dos testes. Soluções do Ery degradado (EryD) foram preparadas previamente a partir de soluções testes do Ery (DMSO 0,01% em meio de cultivo, v/v), expostas a luz branca constante (250 lx, 36W) durante 7 dias, e imediatamente utilizadas nos ensaios. Meio de cultivo e DMSO 0,01% em meio de cultivo (v/v) foram usados como controles negativos.

5.4.2 Manutenção de *Daphnia magna* e exposição

Os testes de toxicidade com o organismo-teste *D. magna* foram realizados no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia, na Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal). Culturas de *D. magna* foram mantidas em sala climatizada a 20ºC ± 2, fotoperíodo de 16:8 horas, em meio de cultivo de água dura composto de água destilada reconstituída com nutrientes (ASTM) de acordo com a *American Society for Testing Materials* (1980), enriquecido com extrato orgânico de algas à base de *Ascophylum nodosum*, pH 7,3 ± 0,2, condutividade de 140-250 µS/cm, oxigênio dissolvido ≥ 3 mg/L e dureza total de 44 ± 4 mg $CaCO_3$/L. Os organismos foram mantidos em aquários de 1 L com densidade de 18-25 adultos/L, e alimentados com suspensão de algas verdes *R. subcapitata* na concentração de 3×10^5 células/mL/organismo. Meio de cultivo e alimento foram renovados a cada dois dias.

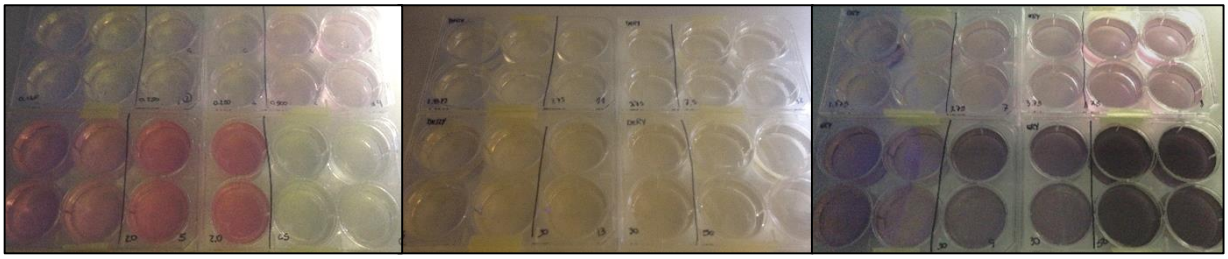
Para a seleção dos neonatos, *D. magna* fêmeas foram cultivadas até a quinta geração e os neonatos com 6-24 h da terceira ninhada foram selecionados e utilizados nos ensaios, aleatoriamente designados aos tratamentos.

5.4.3 Teste de toxicidade aguda

Testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD *Guideline* 202, 2004). Inicialmente, verificou-se a sensibilidade dos organismos-testes à substância de referência dicromato de potássio

($K_2Cr_2O_7$). Após verificar a sensibilidade dos organismos, os neonatos selecionados foram distribuídos para placas para cultura celular de 6 poços contendo 10 mL de solução teste por poço, sendo 5 organismos por repetição e 4 repetições por tratamento (n=20 neonatos/tratamento). Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e 6 concentrações do Ery e EryD (1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 e 50 mg/L) e do BR51 (0,003; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/L) (Figura 31). As placas foram mantidas a 20 ± 2ºC no escuro por 48 h em sistema estático, sem a alimentação dos organismos. Após 48 h de exposição aos tratamentos, a imobilidade dos organismos foi registrada.

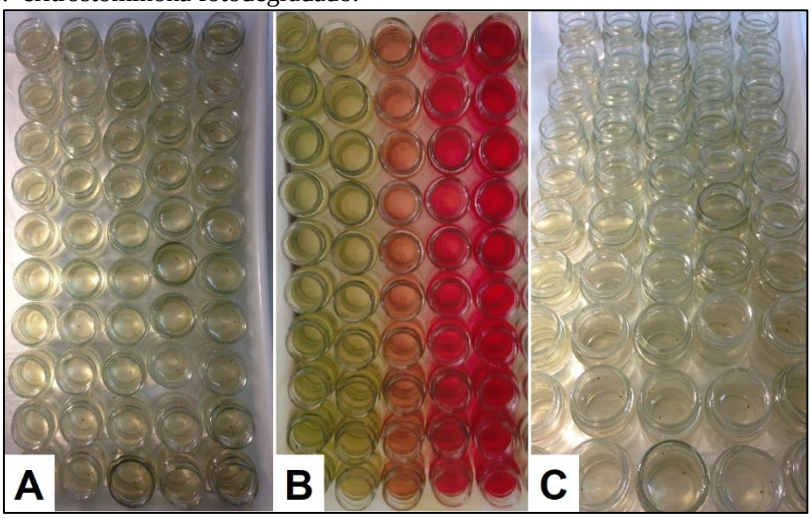
Figura 31. Exposição de *D. magna* em placas para cultura celular de 6 poços, durante 48 h no escuro. Da esquerda para direita: Basic Red 51, eritrostominona fotodegradado, eritrostominona.



5.4.4 Teste de ciclo de vida completo

Testes de ciclo de vida completo (*full life cycle*) foram realizados de acordo com a OECD *Guideline* 211 (2012) para avaliar os efeitos dos compostos ao longo do ciclo de vida dos organismos. Os neonatos selecionados foram distribuídos para frascos de vidro contendo 50 mL de solução teste, sendo 1 organismo por repetição e 10 repetições por tratamento (n=10 neonatos/tratamento). Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e 4 concentrações do Ery e EryD (0,2; 1; 2 e 4 mg/L) e do BR51 (0,001; 0,005; 0,01 e 0,02 mg/L) (Figura 32). Os frascos foram mantidos por 21 dias a 20 ± 2ºC e fotoperíodo de 16:8 horas. Os organismos foram alimentados com suspensão de algas verdes *R. subcapitata* na concentração de 3×10^5 células/mL/organismo. Meio de cultivo e alimento foram renovados a cada 2 dias.

Figura 32. Exposição de *D. magna* aos corantes em recipientes de 50 mL, durante 21 dias. A: Basic Red 51, B: eritrostominona, C: eritrostominona fotodegradado.



Diariamente foi verificado o número de descendentes vivos produzidos por cada organismo, e removidos logo em seguida. Também foi registrada a idade de cada organismo ao produzir a primeira ninhada, e o número total de ninhadas por organismo. Ao final de 21 dias, o comprimento das fêmeas adultas foi registrado, e a taxa intrínseca de crescimento populacional (*r*) foi calculada para cada composto pela equação de *Euler* (PESTANA et al., 2010):

$$1 = \sum_{x=0}^{n} e^{-rx} l_x m_x$$

onde *r* é a taxa de crescimento populacional (por dia), x é a idade em dias (0...n), lx é a probabilidade de sobrevivência na idade x, e mx é a fecundidade na idade x. Pseudovalores das repetições foram gerados utilizando o procedimento jackknife (MEYER et al., 1986).

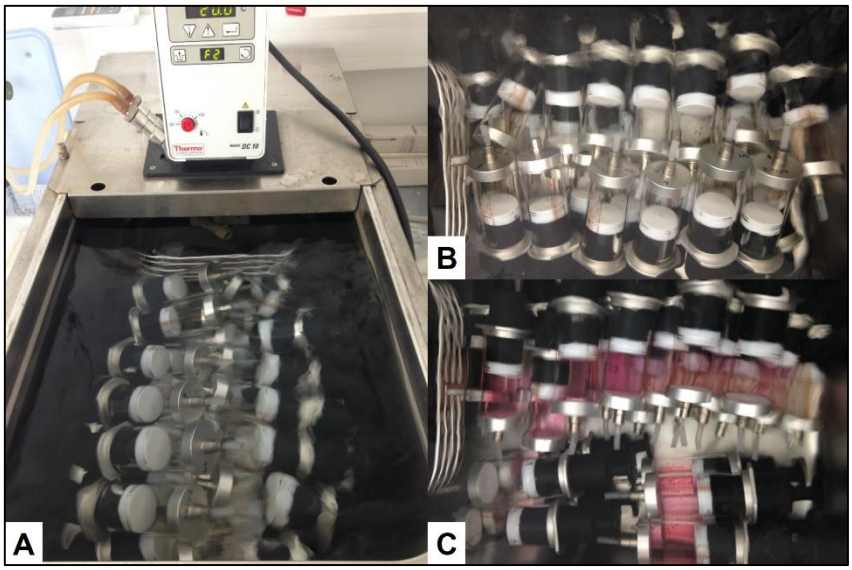
5.4.5 Taxa de respiração

O consumo de oxigênio de *D. magna* foi estimado pelo método padronizado de respirometria de acordo com Pestana et al. (2010). Os neonatos selecionados foram mantidos até 4 dias de idade em meio de cultivo contendo alimento. Ao atingirem 4 dias, eles foram distribuídos para seringas do tipo *gastight* de 50 mL (Hamilton, USA), contendo 30 mL de solução teste, sendo 10 neonatos por repetição e 5 repetições por tratamento (n=50

neonatos/tratamento). Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e 3 concentrações do Ery e EryD (1; 2 e 4 mg/L) e do BR51 (0,005; 0,01 e 0,02 mg/L) (Figura 33). O ar remanescente dentro de cada seringa foi expelido e a concentração do oxigênio inicial foi medida com o medidor de oxigênio modelo 782, equipado com o eletrodo de oxigênio modelo 1302 (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Escócia). As seringas foram mantidas em banho contendo água a 20ºC, no escuro, durante 24 h e sem a adição de alimento.

Após 24 h de exposição, a concentração do oxigênio de cada seringa foi medida novamente, e o consumo foi calculado pela diferença entre o oxigênio inicial e após o período de exposição. A taxa de respiração foi expressa em μg oxigênio consumido/organismo/h. Adicionalmente, 2 seringas controles sem a adição de organismos foram preparadas para cada tratamento, para verificar alterações na concentração de oxigênio por outros fatores que não a respiração dos organismos, utilizadas como fatores de correção.

Figura 33. Exposição de *D. magna* aos corantes em seringas gastight (Hamilton, USA), durante 24 h. (A) Basic Red 51, (B) eritrostominona, (C) eritrostominona fotodegradado.



5.4.6 Ensaio de comportamento

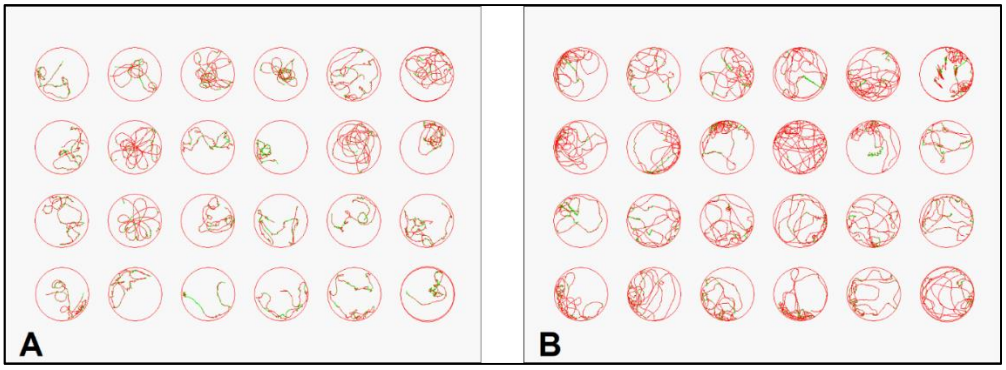
As alterações no comportamento de *D. magna* foram monitoradas utilizando o vídeo rastreador ZebraBox e o software ZebraLab (ViewPoint Life Science, Lyon, França). Os neonatos selecionados foram mantidos até 4 dias de idade em meio de cultivo contendo alimento. Ao atingirem 4 dias, eles foram distribuídos para placas para cultura celular de 6

poços contendo 5 mL de solução teste, sendo 5 neonatos por repetição e 4 repetições por tratamento (n=20 neonatos/tratamento). Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e 3 concentrações do Ery (1; 2 e 4 mg/L) e do BR51 (0,005; 0,01 e 0,02 mg/L). As placas foram mantidas a 20ºC, no escuro, durante 24 h e sem a adição de alimento.

Após 24 h de exposição, os organismos foram individualmente transferidos para placas para cultivo celular de 24 poços contendo 0,5 mL de solução teste, definindo as dimensões da área experimental em 15,5 mm (diâmetro do poço) × 0,5 mm (altura atingida pela solução teste no poço). Dado que o rastreamento é realizado em uma placa por vez, em cada placa foram distribuídos organismos de todos os tratamentos e do respectivo controle negativo, para evitar diferenças devido ao tempo. O rastreamento da locomoção foi realizado sempre no mesmo período do dia (a partir de 1 p.m.), utilizando o sistema de rastreamento de vídeo ZebraBox e ZebraLab software (ViewPoint Life Science, Lyon, França).

Os dois minutos iniciais de rastreamento foram realizados no claro como período de aclimatação para minimizar distúrbios causados na transferência das larvas. Decorrido o período, foram gravados 4 ciclos consecutivos de 5 min cada, alternando claro e escuro (Figura 34), sendo utilizado iluminação LED para os ciclos no claro e luz infravermelha para os ciclos no escuro. Foi utilizado fundo transparente com limite de detecção de 30 frames por segundo para a detecção dos organismos, e a distância mínima de 0,5 mm foi definida como “inativo” para evitar rastreamento de ruído do sistema. Os dados foram automaticamente amostrados a cada 60 segundos (período de integração), com a obtenção dos seguintes parâmetros por organismo: tempo total de natação (TTN em s/min), distância total de natação (DTN em mm/min), velocidade (Vel em mm/s) e número de atividades, definido como quantidade de vezes em que os organismos iniciaram um novo movimento.

Figura 34. Imagens do rastreamento de *D. magna* em placas para cultivo celular de 24 poços. Ciclos no (A) escuro e (B) no claro. Linhas representam o caminho percorrido pelas larvas durante um período de integração (60 s), linhas vermelhas, movimentos acima de 1 mm, linhas verdes, movimentos entre 0,5 e 1 mm.



5.4.7 Manutenção de *Daphnia similis* e exposição

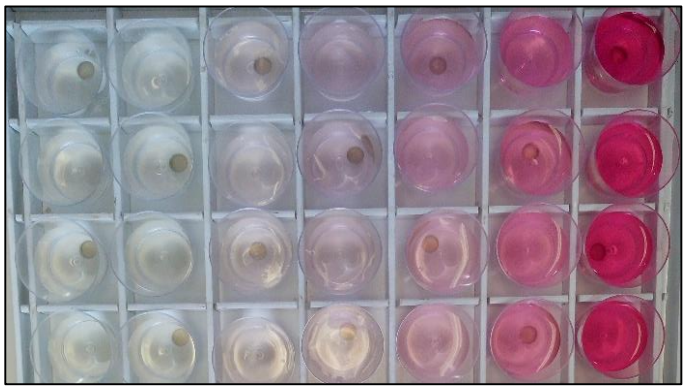
Os testes de toxicidade com o organismo-teste *D. similis* foram conduzidos na Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) (Ribeirão Preto, Brasil), sob supervisão do Dr. Eduardo Angelino Savazzi. Culturas de *D. similis* foram mantidas em estufa incubadora climatizada a 20ºC ± 2, fotoperíodo de 16:8 horas, em meio de cultivo composto de água ultrapura reconstituída com macro e micronutrientes (MS) de acordo com Keating (1985), a pH 7,3 ± 0,3, condutividade de 190-250 µS/cm, oxigênio dissolvido a ≥ 5 mg/L e dureza total de 44 ± 4 mg $CaCO_3$/L. Os organismos foram mantidos em aquários de 2 L com densidade de 20 adultos/L, e alimentados com suspensão de algas verdes *Raphidocelis subcapitata* na concentração de $3,2 \times 10^6$ células/organismo, e com solução de ração para peixe ornamental Tetramin® na concentração de 0,2 mg/mL/organismo. Meio de cultivo e alimentos foram renovados a cada dois dias.

Para a seleção dos neonatos, *D. similis* fêmeas foram cultivadas até a quinta geração e os neonatos com 6-24 h da terceira ninhada foram selecionados e utilizados nos ensaios, aleatoriamente designados aos tratamentos.

5.4.8 Teste de toxicidade aguda

Testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com a OECD *Guideline* 202 (2004). Inicialmente, verificou-se a sensibilidade dos organismos-testes à substância de referência cloreto de potássio (KCl). Após confirmar a sanidade dos organismos, os neonatos selecionados foram distribuídos para frascos contendo 10 mL de solução teste cada, sendo 5 organismos por repetição e 4 repetições por tratamento (n=20 neonatos/tratamento). Foram realizados os tratamentos dos controles negativos e 6 concentrações do Ery (5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L) (Figura 35). Os frascos foram mantidos a 20 ± 2ºC no escuro por 48 h em sistema estático, sem a alimentação dos organismos. Após 48 h de exposição aos tratamentos, a imobilidade dos organismos foi registrada.

Figura 35. Exposição de *D. similis* ao corante eritrostominona (Ery) em recipientes de 10 mL, durante 48 h. Da esquerda para direita: branco, controle negativo, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L de Ery.



5.4.9 Análises Estatísticas

Após verificar a distribuição e variância dos dados (normalidade e homocedasticidade) com os testes de Shapiro-Wilk and Levene Median, respectivamente, One-way ANOVA foi aplicada para dados de consumo de oxigênio e ciclo de vida completo, e Two-way ANOVA foi aplicada para dados de comportamento (fatores fixos: tratamentos e ciclos de claro/escuro). No caso da normalidade e/ou homocedasticidade falhar, foi aplicada ANOVA on ranks (Kruskall-Wallis). O teste de Dunnett (nível de significância de 5%) foi aplicado para verificar diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e seus respectivos controles negativos, utilizando o software Sigma Plot 12.5 (SysStat, San Jose, California, USA). Os valores de Concentração de Efeito Observado (CEO) também foram definidos. As concentrações efetivas médias (CE_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança (limites superiores e inferiores) foram calculados pelo método trimmed Spearman-Karber (HAMILTON et al., 1977).

5.5 Resultados

5.5.1 Imobilidade

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para a imobilidade de *D. magna* expostas ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 8. Não foi observada a imobilidade dos organismos dos controles (meio de cultivo e 0,01% DMSO em meio de cultivo). As 48-h CE_{50} estimadas para o BR51 e Ery foram de 0,10 mg/L (0,09–0,11) and 19,7 mg/L (15,7–24,9), respectivamente, com um aumento na imobilidade de maneira dose-dependente (Figura 36A). As comparações entre os tratamentos e controles definiram a CEO

de 0,125 mg/L para o BR51, com 85% dos organismos imóveis, e 15 mg/L para o Ery, com 35% dos organismos imóveis. Por outro lado, o EryD não causou a imobilidade significativa dos organismos expostos (Figura 36A, Tabela 8).

Em relação à toxicidade aguda para *D. similis*, o corante natural Ery apresentou 48-h CE_{50} de 29,02 mg/L (24,93–33,81). Os resultados mostraram uma resposta dose-dependente em relação a imobilidade dos organismos expostos ao corante, com a CEO de 20 mg/L capaz de imobilizar 25% dos organismos em relação ao controle.

Figura 36. Efeitos do Basic Red 51 (BR51), eritrostominona (Ery) and eritrostominona degradada (EryD) para *D. magna*. A: Imobilidade dos neonatos. B: número total de neonatos por fêmea adulta. C: idade das fêmeas na primeira reprodução. D: comprimento corporal das fêmeas adultas com 21 dias. E: taxa intrínseca de crescimento populacional (*r*). F: consumo de oxigênio.

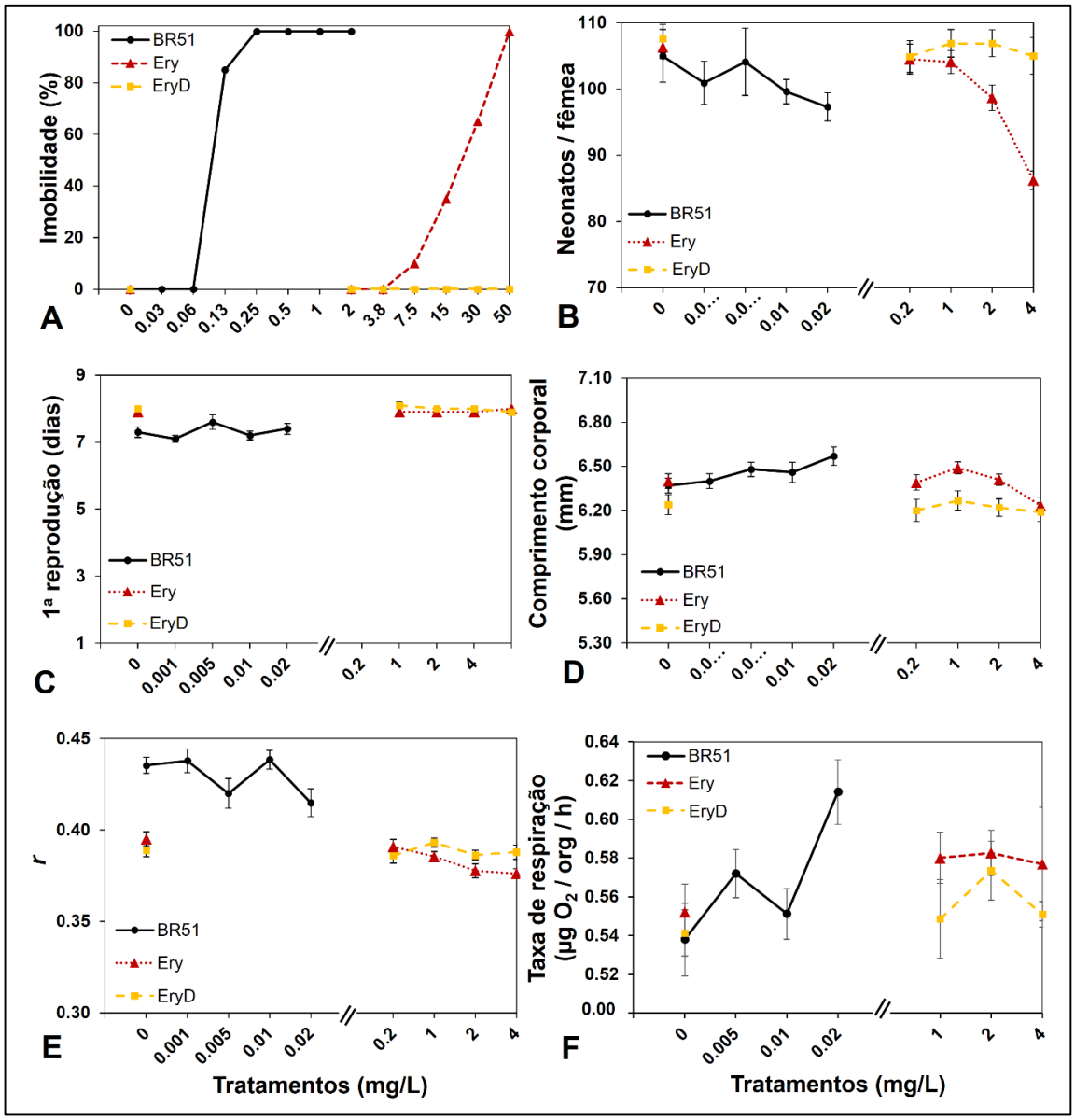


Tabela 8. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para a imobilidade, ciclo de vida, e consumo de oxigênio de *D. magna*.

Parâmetro	BR51			Ery			EryD		
	CEO	ANOVA		CEO	ANOVA		CEO	ANOVA	
Imobilidade	0,125	$F_{(7;24)}$=814	p<0,001	15	$F_{(6;21)}$=71,9	p<0,001	−		
Idade na 1ª ninhada	−	H=5,02	p=0,285	−	H=1,07	p=0,900	−	H=4,90	p=0,298
Neonatos/fêmea:									
1ª ninhada	−	$F_{(4;45)}$=0,897	p=0,474	−	$F_{(4;45)}$=2,39	p=0,004	−	$F_{(4;45)}$=0,61	p=0,658
2ª ninhada	0,02	$F_{(4;45)}$=2,42	p=0,042	2	$F_{(4;45)}$=7,35	p<0,001	−	$F_{(4;45)}$=2,39	p=0,060
3ª ninhada	−	$F_{(4;45)}$=0,804	p=0,529	4	$F_{(4;45)}$=38,7	p<0,001	−	$F_{(4;45)}$=0,52	p=0,722
4ª ninhada	−	$F_{(4;45)}$=0,643	p=0,635	4	$F_{(4;45)}$=0,85	p=0,501	−	$F_{(4;45)}$=3,21	p=0,051
5ª ninhada	−	$F_{(4;45)}$=0,364	p=0,833	4	$F_{(4;45)}$=3,26	p=0,020	−	$F_{(4;45)}$=0,49	p=0,747
Nº neonatos/fêmea	−	$F_{(4;45)}$=0,838	p=0,508	4	$F_{(4;45)}$=18,3	p<0,001	−	$F_{(4;45)}$=1,93	p=0,122
Tamanho da fêmea	−	$F_{(4;45)}$=1,88	p=0,130	−	$F_{(4;45)}$=1,55	p=0,074	−	$F_{(4;45)}$=1,05	p=0,391
r	−	$F_{(4;45)}$=2,85	p=0,035	4	$F_{(4;45)}$=5,58	p<0,001	−	$F_{(4;45)}$=0,72	p=0,584
Consumo de O_2	0,02	$F_{(3;16)}$=4,64	p=0,016	−	$F_{(3;16)}$=0,44	p=0,7260	−	$F_{(3;16)}$=0,75	p=0,5440

−nenhum efeito significativo.

5.5.2 Ciclo de vida completo

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para o ciclo de vida de *D. magna* expostas ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 8. Em todos os experimentos, as fêmeas apresentaram cinco ninhadas até 21 dias de exposição. Entretanto, o BR51 e Ery diminuíram significantemente o número de neonatos por fêmea (Figura 36B). Os organismos expostos a 0,02 mg/L de BR51 apresentaram 14% menos neonatos na segunda ninhada, mas recuperou o número total de neonatos nas ninhadas posteriores (Tabela 8). Já a exposição ao Ery reduziu em 25% o número de neonatos da segunda ninhada na concentração de 2 mg/L, mas também recuperou o número de neonatos nas ninhadas posteriores. Entretanto, 4 mg/L do Ery impossibilitou a recuperação, e o número de neonatos foi reduzido da segunda até a última ninhada em 28, 38, 7 e 31%, respectivamente (Tabela 8). Esta redução do número de neonatos de forma não tempo-dependente a 4 mg/L do Ery indica uma tentativa de recuperação dos organismos adultos, porém insuficiente para evitar a diminuição na taxa intrínseca de crescimento populacional (*r*) dos organismos. Por outro lado, o EryD não induziu efeitos nos organismos expostos (Figura 36).

A exposição ao BR51, Ery e EryD não alterou a idade em que as fêmeas apresentaram a primeira ninhada e o comprimento dos organismos após 21 dias, comparados aos organismos dos respectivos controles (Figura 36C e D, Tabela 8).

5.5.3 Taxa de respiração

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para a taxa de respiração de *D. magna* expostas ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 8. *D. magna* expostas ao BR51 aumentaram significantemente o consumo de oxigênio em 14%, comparadas com o respectivo controle (CEO=0,02 mg/L), enquanto que o Ery e o EryD não alteraram a taxa de respiração dos organismos expostos (Figura 36F).

5.5.4 Atividade locomotora

A atividade locomotora foi monitorada em distância total de natação (DTN, mm/min), tempo total de natação (TTN, s/min), velocidade (Vel, mm/s) e número de atividades, definido como quantidade de vezes em que os organismos iniciam um novo movimento. Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para a atividade locomotora de *D. magna* expostas ao Ery, EryD e BR51 estão apresentados na Tabela 9. Todos as *D. magna* dos controles e tratamentos nadaram distâncias mais longas durante os ciclos no claro, e aumentaram o número de atividades nos ciclos no escuro, mantendo este padrão de natação.

A exposição ao Ery alterou o número de atividade dos organismos, independentemente do estímulo de luz. Nos ciclos no claro e escuro, os organismos aumentaram o número de atividades (CEO=2 mg/L), sem causar alterações na Vel, DTN e TTN, quando comparados com o respectivo controle (Figura 37A-D).

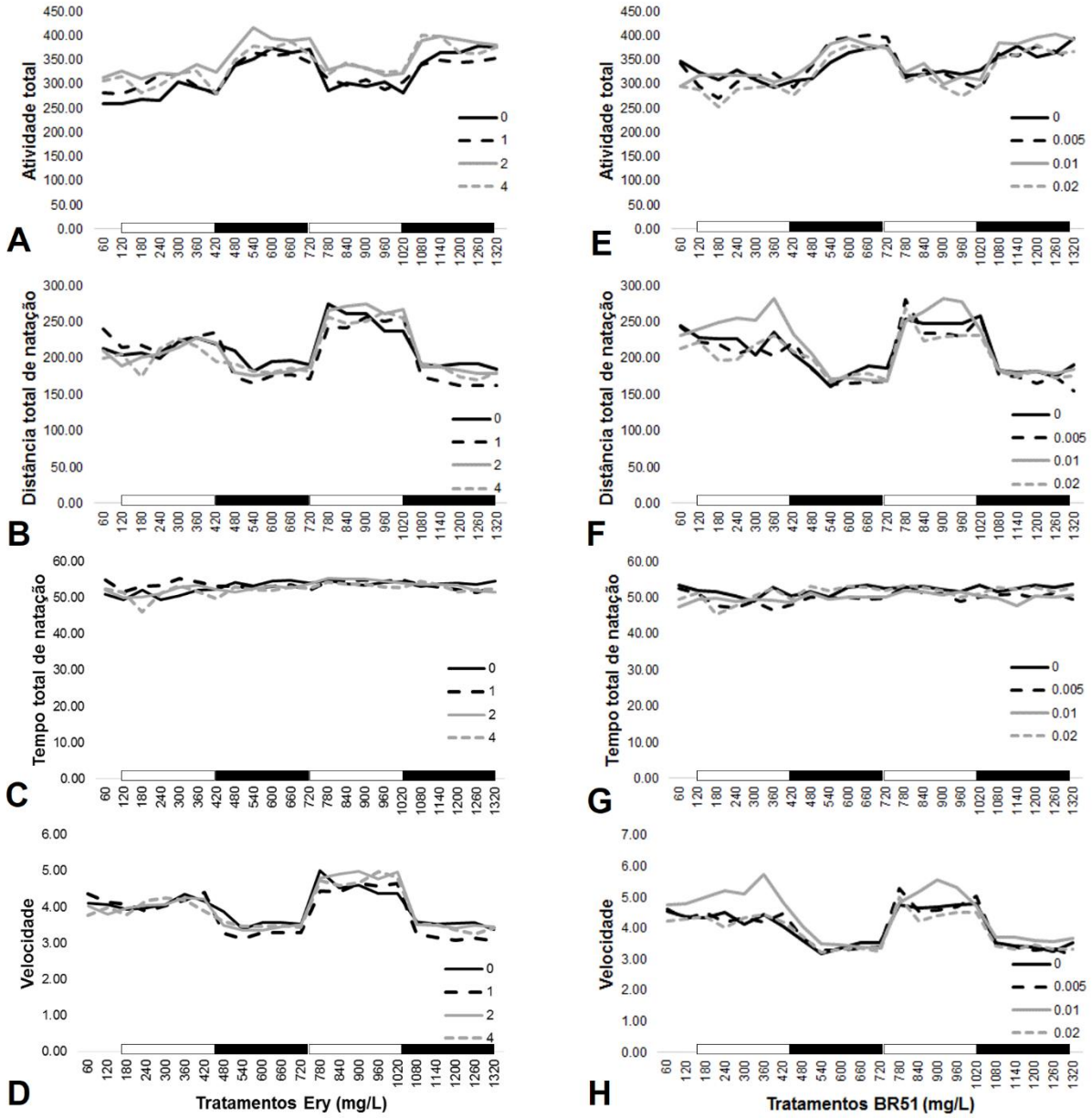
O BR51 alterou a locomoção dos organismos no ciclo com estímulo da luz. Os organismos nadaram distâncias mais longas e foram mais velozes na concentração de 0,01 mg/L (Figura 37E-H). Entretanto, na maior concentração testada de 0,02 mg/L não houveram alterações significativas (Figura 37E-H). Nos ciclos no escuro, não foram observados efeitos nos parâmetros avaliados para o BR51 (Figura 37E-H).

Tabela 9. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) e seu fotodegradado (EryD) e do Basic Red 51 (BR51) para o comportamento de *D. magna*.

Parâmetro	BR51			Ery		
	CEO*	ANOVA		CEO	ANOVA	
Distância (mm)						
Claro	0,010	$F_{(3;56)}$=3,84	p=0,014	–	$F_{(3;56)}$=2,42	p=0,075
Escuro	–	$F_{(3;56)}$=1,31	p=0,232	–	$F_{(3;56)}$=1,58	p=0,122
Tempo (s)						
Claro	–	$F_{(3;56)}$=1,73	p=0,171	–	$F_{(3;56)}$=1,44	p=0,240
Escuro	–	$F_{(3;56)}$=2,50	p=0,072	–	$F_{(3;56)}$=2,45	p=0,073
Velocidade (mm/s)						
Claro	0,010	$F_{(3;56)}$=7,14	p<0,001	–	$F_{(3;56)}$=2,34	p=0,082
Escuro	–	$F_{(3;56)}$=2,55	p=0,065	–	$F_{(3;56)}$=1,98	p=0,096
Atividade						
Claro	–	$F_{(3;56)}$=1,70	p=0,117	2	$F_{(3;56)}$=11,6	p<0,001
Escuro	–	$F_{(3;56)}$=1,26	p=0,295	2	$F_{(3;56)}$=17,6	p<0,001

–nenhum efeito significativo; * respostas não dose-dependentes, efeito observado somente em 0,01 mg/L.

Figura 37. Comportamento de *D. magna* após 24 h de exposição ao eritrostominona (Ery) (A-D) e ao Basic Red 51 (BR51) (E-H). Valores apresentados em média de neonatos (n=20) por minuto.



5.6 Discussão

Nossos resultados mostraram que o BR51 e o Ery induziram efeitos adversos na imobilidade, reprodução, metabolismo e locomoção das *D. magna*. Diversos estudos ecotoxicológicos de corantes azo reportaram CE_{50} próximas à encontrada para o BR51, como a 48-h CE_{50} do corante Verde Malaquita de 0,77 mg/L (KANHERE et al., 2014) e a 48-h CE_{50} do Disperse Red 1 de 0,58 mg/L para *D. magna*, baseadas na imobilização dos organismos (VACCHI et al., 2016). O Disperse Red 1 também se mostrou tóxico para outros

microcrustáceos, como *D. similis* (48-h CE_{50} de 5,5 mg/L) (YU et al., 2015), *Ceriodaphnia dubia* (48-h CE_{50} de 0,55 mg/L) e *Ceriodaphnia silvestrii* (48-h CE_{50} de 0,8 mg/L) (VACCHI et al., 2016). Em contraste, valores elevados de CE_{50} de 6-55 mg/L para *D. magna* também foram reportados para outros corantes azo (BAE; FREEMAN, 2007; VERMA, 2008; DARSANA et al., 2015). De acordo com os dados da literatura, a toxicidade dos corantes azo varia de espécie para espécie e de acordo com a estrutura química dos corantes, o que pode ser devido às diferentes sensibilidades dos organismos frente as diversas estruturas azo, mesmo que elas sejam estreitamente relacionadas (CAMPOS et al., 2014), reforçando a necessidade de testar os compostos individualmente.

Em relação à exposição prolongada, ambos os corantes BR51 e Ery alteraram a reprodução da *D. magna*. Especificamente sobre o BR51, o corante reduziu o número de neonatos na segunda ninhada, mas as fêmeas recuperaram o número de neonatos nas ninhadas posteriores, uma provável resposta adaptativa após exposições prolongadas. Estudos com o corante azo Disperse Red 1 também mostraram efeitos tóxicos na reprodução de microcrustáceos em concentrações na faixa de microgramas, o qual inibiu a reprodução de *D. similis* a 0,003 mg/L após 14 dias de exposição, e de *Ceriodaphnia dubia* a 0,1 mg/L após 7 de exposição (VACCHI et al., 2016). Da mesma forma, o Ery reduziu o número de neonatos da segunda ninhada, com posterior recuperação que, no entanto, não ocorreu quando a concentração do corante foi aumentada. As fêmeas apresentaram uma resposta de forma não tempo-dependente que indicou uma tentativa de recuperação, porém insuficiente para evitar a diminuição na taxa intrínseca de crescimento populacional (r) dos organismos.

Concentrações subletais do BR51 também aumentaram significativamente o consumo de oxigênio e alteraram o comportamento dos juvenis de *D. magna* após exposições rápidas. A elevação da taxa metabólica dos organismos era esperada, uma vez que organismos aquáticos expostos ao BR51, assim como a outros corantes azo, elevam a atividade do sistema de detoxificação (LI et al., 2012; YU et al., 2015; ABE et al., 2017b, apresentado no Capítulo 3), o qual demanda gasto metabólico. Este aumento na taxa de respiração dos organismos expostos ao BR51 também coincide com a concentração em que as fêmeas adultas recuperaram o número total de neonatos, processo fisiológico que demanda energia. Além disso, o corante estimulou os juvenis a nadarem mais rápido e percorrerem distâncias mais longas ao serem estimulados pela luz. Contudo, este efeito não ocorre quando a concentração do corante foi aumentada, uma possível tentativa de adaptar os gastos energéticos frente os processos de detoxificação.

Por outro lado, o Ery não alterou o consumo de oxigênio dos juvenis após exposições rápidas, mas aumentou a sua atividade natatória, independente do estímulo de luz, e reduziu o número de neonatos, o que sugere uma alteração na alocação da energia. Visto que o Ery também eleva a atividade de detoxificação (ABE et al., 2017b, apresentado no Capítulo 3), a alocação de energia para outras funções fisiológicas que não as basais podem sofrer alterações. Todavia, os efeitos foram observados em concentrações até 200 vezes maiores do que as do BR51.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o BR51 foi mais tóxico que o Ery em relação às CE_{50} e CEO calculados para *D. magna*. Segundo o sistema de classificação de perigo aquático agudo do GHS (2009), o BR51 classifica-se como muito tóxico para o ambiente aquático e o Ery como prejudicial. Já a exposição prolongada do BR51 o classifica na categoria "muito tóxico com efeitos duradouros para o ambiente aquático", enquanto o Ery se classifica na categoria "pode causar efeitos duradouros", de acordo com a classificação de perigo aquático a longo prazo.

Nossos resultados também demonstraram que após a fotodegradação do corante natural, o produto incolor formado não foi capaz de induzir qualquer efeito tóxico nas *D. magna* nas condições testadas, e mostra a perda das características tóxicas da estrutura molecular original. Do ponto de vista ecológico, as concentrações ambientais dos corantes azo encontradas nos recursos hídricos são diversificadas, variando de 10 até 50 mg/L em efluentes de indústrias têxteis (O'NEILL et al., 1999) e de 0,4 a 102,7 µg/L em águas superficiais, segundo a *Environment Canada Health Canada* (ECHC, 2013a,b). Como foi observado, o BR51 alterou a reprodução, taxa de respiração e comportamento de *D. magna* em concentrações passíveis de serem encontradas no ambiente, as quais podem comprometer a sobrevivência em um cenário mais realístico. O Ery mostrou-se tóxico para a reprodução e comportamento dos daphnídeos em concentrações elevadas, mas também prováveis de serem encontradas no ambiente. A ausência de efeitos adversos do Ery após a fotodegradação pode prevenir os efeitos tóxicos no ambiente aquático, enquanto os corantes sintéticos são de difícil remoção devido à elevada estabilidade das moléculas (O'NEILL et al., 1999; CHUNG, 2000). Como observado previamente, o BR51 não é fotodegradável (ABE et al., 2017a, apresentado no Capítulo 2), enquanto a biodegradabilidade do Ery o torna um potencial corante *eco-friendly*.

Em relação à toxicidade aguda para *D. similis* expostas ao Ery, esta espécie apresentou menor sensibilidade ao corante, de acordo com a 48-h CE_{50} 32% maior em comparação com a

48-h CE_{50} calculada para *D. magna*. Ainda assim, esta diferença na sensibilidade dos organismos ao Ery não foi o suficiente para alterar a classificação do corante em prejudicial para a vida aquática, de acordo com a GHS (2009). Portanto, ambas as espécies possuem sensibilidades correlacionadas para o Ery, e para diversos outros contaminantes (RODGHER et al., 2010; BURATINI et al., 2014). Desta forma, o uso da *D. similis* em países tropicais, considerando que a *D. magna* não ocorre naturalmente nestas regiões, possibilita extrapolar os resultados a ambientes mais realísticos.

5.7 Conclusão

Em síntese, nosso trabalho demonstrou que o corante natural Ery e o sintético BR51 são tóxicos para *D. magna*, e concentrações até 200 vezes baixas do BR51 já causam danos, comparadas às concentrações do Ery. O Ery e o BR51 reduzem o número de neonatos de fêmeas adultas em exposições prolongadas e elevam a atividade locomotora de juvenis em exposições agudas. O BR51 também aumenta a taxa de respiração dos juvenis após exposições rápidas, um possível efeito devido às alterações na demanda energética e na alocação de energia. Finalmente, a degradação do corante natural forma um produto incolor e não tóxico para *D. magna* nas condições testadas, o que destaca o Ery como uma potencial alternativa aos corantes sintéticos devido à sua fácil biodegradação pela luz antes de ser lançado ao ambiente aquático.

Capítulo

06

SAÚDE HUMANA:

Hepatócitos e epiderme

Life history and behavior effects of dyes on *Daphnia magna*

Flavia R. Abe,[1] Camila Mini,[1] Daniela M. Leme,[2] Danielle P. de Oliveira,[1]

[1]School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [2]Department of Genetic, Federal University of Paraná, 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil.

*corresponding author: frabe@usp.br

A ser submetido à *Toxicology in vitro*.

6.1 Resumo

Para avaliar a toxicidade do corante natural eritrostominona (Ery) para a saúde humana, testes foram realizados em hepatócitos imortalizados de carcinoma humano (HepG2) e em epiderme humana equivalente (EHE) construída com queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Ambas as linhagens celulares são amplamente utilizadas em avaliações toxicológicas devido à elevada reprodutibilidade e capacidade de proliferação. Além disso, a capacidade de proteção ao estresse oxidativo do Ery foi avaliada em mitocôndrias hepáticas de ratos Wistar. O Ery protegeu as mitocôndrias do estresse oxidativo, mas reduziu a viabilidade celular de HepG2 de maneira dose-dependente. O principal mecanismo de morte celular apresentado foi a apoptose. No entanto, esse efeito pode ser resultado da indução de atividade pró-oxidante em uma célula de rápida proliferação. O Ery também atrasou significativamente o ciclo celular de HepG2, com um acúmulo de células na fase da mitose e, consequentemente, uma redução na quantidade de células da fase de crescimento celular, entretanto não alterou as células em fase de duplicação de DNA. Por outro lado, o Ery não induziu efeitos genotóxicos em HepG2 e em EHE. Neste último modelo também não foram observados efeitos citotóxicos. Em conclusão, o Ery possui potencial aplicabilidade para uso industrial como uma alternativa aos corantes sintéticos. Entretanto, ensaios adicionais devem avaliar os mecanismos dos efeitos antioxidantes e pró-apoptóticos e os respectivos riscos que oferecem para a saúde humana.[5]

Palavras-chaves: Eritrostominona, hepatócitos, epiderme humana equivalente, toxicidade.

6.2 Abstract

To assess the toxicity of the natural dye erythrostominone (Ery) to human health, tests were performed on immortalized hepatocytes of human carcinoma (HepG2) and human epidermis equivalent (EHE) constructed with immortalized human keratinocytes (HaCaT). Both cell lines are widely used in toxicological evaluations due to their high reproducibility and proliferation capacity. In addition, the protective capacity for oxidative stress of Ery was evaluated in hepatic mitochondria of Wistar rats. Results showed that Ery protected the mitochondria from oxidative stress but reduced the cell viability of HepG2 in a dose-dependent manner. The main mechanism of cell death was apoptosis. However, this effect may be the result of the capacity of induction of pro-oxidant activity in a rapidly proliferating cell. Ery also significantly delayed the cell cycle of HepG2, with accumulation of cells in the mitosis phase and consequently a reduction in the amount of cells of the cell growth phase, but did not alter the cells in the phase of DNA duplication. On the other hand, Ery did not induce genotoxic effects on HepG2 and EHE, as well as cytotoxic effects on EHE. In conclusion, Ery has potential applicability for industrial use as an alternative to synthetic dyes use. However, additional trials should evaluate the mechanisms of antioxidant and pro-apoptotic effects and the respective risks they pose to human health.

[5] **Os dados referentes a este capítulo serão submetidos à publicação no periódico *Toxicology in vitro*.**

6.3 Introdução

Os humanos estão expostos aos corantes por diferentes vias de exposição, dentre elas o contato dérmico e a ingestão. 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). Ensaios *in vitro* utilizando a engenharia de pele humana também se destacam, visto que estes modelos permitem avaliar os agentes químicos em um ambiente biomimético. A 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).

Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do corante natural eritrostominona (Ery) para hepatócitos humanos (HepG2) e epiderme humana equivalente (EHE) produzida em um sistema de cultivo celular tridimensional de queratinócitos humanos (HaCaT). Devido ao elevado potencial genotóxico e/ou mutagênico de corantes azo, foram avaliados os efeitos genotóxicos e mutagênicos do Ery para HepG2, e os efeitos genotóxicos para EHE, além da determinação da viabilidade celular de ambos os modelos. O ciclo celular de HepG2 também foi avaliado, para verificar efeitos na proliferação celular. O corante natural também foi avaliado quanto ao potencial de proteção ao estresse oxidativo induzido em mitocôndrias hepáticas de ratos Wistar.

6.4 Materiais e Métodos

6.4.1 Corante em estudo

O corante natural Ery (CAS n.º 26153-04-8, MW: 348,08 g/mol, pureza 92%) foi extraído de fungo endofítico cepa LC01-A (espécie em fase de identificação, cedida pela CCMA, EMBRAPA, Brasil), purificado e caracterizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de Química da FFCLRP, USP (Ribeirão Preto, Brasil).

6.4.2 Proteção à Espécies Reativas de Oxigênio

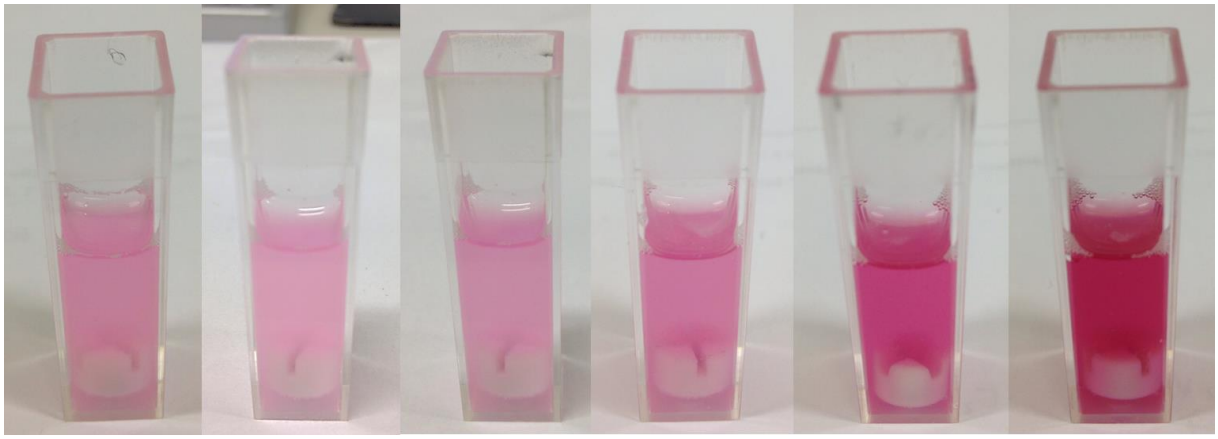
A proteção ao estresse oxidativo foi avaliada pela capacidade do Ery proteger a formação de EROs em mitocôndrias. Para isso, foram utilizados 12 ratos Wistar jovens, com peso entre 150 a 200 g, fornecidos pelo Biotério Central da USP (Ribeirão Preto, Brasil). Os animais foram mantidos no Biotério da FCFRP, em gaiolas forradas com maravalha, sendo 4 animais/1.248 cm^2, ração e água filtrada *ad libidum*, a 19-23ºC e fotoperíodo de 12 h. Os animais foram eutanasiados no biotério por decapitação, sem o uso de anestésicos para não interferir nos parâmetros das mitocôndrias. Após a eutanásia, foi feito um corte sagital para coleta do fígado do animal, e o experimento foi continuado em laboratório. Todos os procedimentos foram realizados com materiais cirúrgicos estéreis e o descarte dos animais foi feito em sacos de lixo contaminante armazenados a -18°C e posteriormente descartados sob cuidados do biotério. O projeto foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo 13.1.808.53.3 emitido em 02/12/2013).

Após a coleta do fígado, o órgão foi picotado e lavado em meio de homogeneização (sacarose 250 mM, EGTA 1 mM, HEPES KOH 10 mM, pH 7,2), e transferido para tubos de vidro borossilicato submersos em gelo. O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado repetidas vezes em homogeneizador Potter-Elvehjem (Novatecnica Equipamentos para Laboratórios Ltda, Brasil), até a dissociação total do tecido, e sucessivamente centrifugado (5, 10 e 15 min a 770, 9.800 e 4.500 × *g*, respectivamente, 4ºC) com intervalos de ressuspensão em meio de lavagem (sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM, HEPES KOH 10 mM, pH 7,2). Ao final das centrifugações, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de meio de ressuspensão (sacarose 250 mM, HEPES KOH 10 mM, pH 7,2) para a obtenção da suspensão mitocondrial (PEDERSEN et al., 1978).

O potencial de proteção às Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) foi monitorado espectrofluorimetricamente utilizando a sonda fluorescente 2’,7’-diacetato de diclorodiidrofluoresceína (H_2DCF-DA), uma molécula que atravessa facilmente as membranas biológicas e é hidrolisada por esterases, liberando o composto não fluorescente 2,7-diclorofluoresceína reduzida (DCF-H). Na presença de EROs, a DCF-H é rapidamente oxidada e transformada em 2,7-diclorofluoresceína (DCF), a qual apresenta alto rendimento quântico de fluorescência quando excitado em 503 nm. Sendo assim, a produção de EROs pelas mitocôndrias foi determinada pelo aumento diretamente proporcional da fluorescência nos comprimentos de onda de 503 nm para excitação e 529 nm para emissão (AMES et al., 1993).

Previamente, as mitocôndrias foram incubadas em meio de reação (sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES KOH 10 mM, pH 7,2) acrescido com rotenona (2,5 µmol/L) e H_2DCF-DA (2,0 µmol/L) e energizadas pela adição de succinato de potássio (5 mmol/L). Em seguida, foram realizados os tratamentos do branco, controle negativo, controle positivo t-butil-hidroperóxido (t-BOOH 300 µmol/L) e 5 concentrações do Ery (0,1; 1,0; 10; 25 e 50 mg/L) (Figura 38). O controle positivo foi adicionado em todos os tratamentos para avaliar a capacidade de proteção do corante natural.

Figura 38. Mitocôndrias isoladas de fígado de rato incubadas com o corante Ery. Da esquerda para direita: controle negativo; 0,1; 1; 10; 25 e 50 mg/L.



6.4.3 Manutenção das culturas celulares

Os testes de toxicidade em células humanas foram realizados em linhagens celulares da *American Type Culture Collection* (ATCC) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para avaliar a toxicidade do Ery em hepatócitos humanos, foram utilizadas células imortalizadas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2, BCRJ n.º 0103, ATCC n.º HB-8065). Para avaliar a toxicidade do Ery em células de pele humana (epiderme humana equivalente), foram utilizadas células imortalizadas de queratinócitos humanos (HaCaT, BCRJ n.º 0341) e fibroblastos de prepúcio humano (HFF-1, BCRJ n.º 0275, ATCC n.º SCRC-1041).

As células humanas foram estocadas em frascos criogênicos contendo soro bovino fetal (SBF) e dimetil sulfóxido (DMSO), e congeladas em nitrogênio líquido. No período de realização dos ensaios, as células foram previamente descongeladas e transferidas para frascos para cultivo celular estéreis (75 a 150 cm^2), contendo o meio de cultivo *Dulbecco's Modified*

Eagle Medium (DMEM) suplementado com SBF e antibióticos, sendo mantidos em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2 (Tabela 10).

Subculturas celulares foram preparadas quando as culturas atingiam aproximadamente 80% de confluência. Neste processo, os meios de cultivo eram descartados, as células lavadas com tampão salino fosfato (PBS) e expostas à tripsina-EDTA em tampão PSB a 37ºC (Tabela 10), para o desprendimento das células pela degradação da matriz glicoproteíca extracelular com a ação de enzimas proteolíticas. Após o desprendimento, as enzimas proteolíticas eram inativadas com DMEM suplementado, e o conteúdo centrifugado (1.500 rpm, 5 min, 25ºC). O precipitado era ressuspendido e subcultivado em frascos de cultivo celular novos. Após o desprendimento celular dos frascos, as células foram contadas em Câmara de Neubauer para a obtenção da quantidade necessária de células conforme o ensaio realizado.

Tabela 10. Soluções para cultivo (v/v) e manutenção das culturas celulares humanas.

	HepG2	HaCaT	HFF-1
Solução de congelamento	SBF e DMSO (95:5)	SBF e DMSO (9:1)	SBF e DMSO (95:5)
Meio de cultivo	DMEM (4,5 g/L glucose, 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1.500 mg/L bicarbonato de sódio)	DMEM (4,5 g/L glucose, 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1.500 mg/L bicarbonato de sódio)	DMEM (4,5 g/L glucose, 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1.500 mg/L bicarbonato de sódio)
Suplementos	SBF 10% Penicilina 1 U/mL Estreptomicina 1 µg/mL	SBF 10% Penicilina 1 U/mL Estreptomicina 1 µg/mL	SBF 15% Penicilina 1 U/mL Estreptomicina 1 µg/mL
Manutenção	37ºC e 5% de CO_2	37ºC e 5% de CO_2	37ºC e 5% de CO_2
Desprendimento	Tripsina-EDTA 0,1% em tampão PBS	Tripsina-EDTA 0,25% em tampão PBS	Tripsina-EDTA 0,25% em tampão PBS

6.4.4 Exposição e ensaios em HepG2

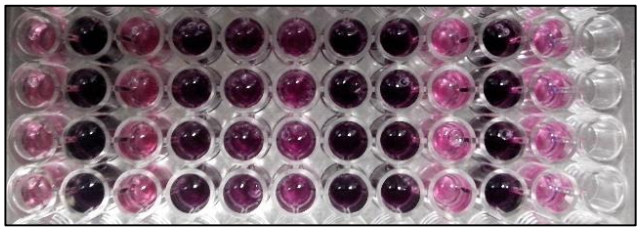
As culturas celulares de HepG2 foram preparadas em monocamada, e a exposição foi realizada de forma submersa, com a adição do Ery no meio de cultivo. Devido à lipossolubilidade do Ery, a concentração máxima testada foi de 696 mg/L para o teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e 522 mg/L para os demais ensaios, com saturação das soluções testes visivelmente excedida em concentrações a partir de 435 mg/L. Soluções estoques do Ery foram preparadas em DMSO e diluídas em meio de cultivo (DMEM 1%, v/v) imediatamente antes do início dos testes. Meio de cultivo e DMSO 1% em

meio de cultivo (v/v) foram utilizados como controles negativos. Os controles positivos foram selecionados de acordo com os ensaios realizados.

6.4.4.1 Citotoxicidade pelo teste de MTT

Testes de MTT foram realizados de acordo com Denizot e Lang (1986), para quantificar a capacidade das células em converter o MTT, de coloração amarela, em sal de formazan, de coloração roxa. Células viáveis são verificadas pela quantificação do sal formado, determinado em absorbância. As células foram semeadas em placas para cultura celular de 96 poços (2×10^3 células/poço) contendo 200 µL de solução teste cada poço, e mantidas por 24 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2. Após o período, foram realizados os tratamentos dos controles negativos, do controle positivo carbonoil cianeto m-clorofenilhidrazona (100 µM) e 8 concentrações do Ery (35, 87, 174, 261, 348, 435, 522 e 696 mg/L) (Figura 39). Os testes foram realizados em quadruplicatas independentes, e cada tratamento foi realizado com 4 repetições, sendo 1 poço por repetição (n=4×4 poços/tratamento). As placas foram mantidas por 24 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2.

Figura 39. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery). Da esquerda para direita: controle positivo, 696, 35, 261, 174, 87, 435, 348 mg/L de Ery, e controle negativo.



Após 24 h de exposição aos tratamentos, as células lavadas com tampão PBS e expostas ao MTT (5 mg/mL em tampão PBS) diluído em DMEM sem vermelho de fenol (9:1, v/v). As placas foram mantidas por 3 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2 para que as enzimas das células viáveis reduzissem o MTT (amarelo) a sal de formazan (roxo). Para findar a redução, o conteúdo dos poços foi descartado e imediatamente adicionado 200 µL de DMSO para a extração dos sais, juntamente com 20 µL de tampão glicina (0,2 mol/L em água ultrapura, pH 10,2) para uma melhor solubilização dos sais formados. DMSO e tampão glicina foram utilizados como branco. A leitura espectrofotométrica foi determinada em quadruplicata a 570 nm, em leitor de microplaca (Varian Cary 50MPR UV/-Vis Spectrophotometer, Agilent, EUA).

A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com as absorbâncias do controle negativo e dos tratamentos com Ery:

$$\%\ Células\ viáveis = \frac{A_t}{A_c} \times 100$$

onde A_t corresponde a absorbância média do tratamento, e A_c a do controle negativo.

6.4.4.2 Citotoxicidade pelo teste de anexina V / PI

Testes de anexina V / PI foram realizados de acordo com Zhivotovsky et al. (1999), para verificar e quantificar a morte celular por apoptose e/ou necrose. As células foram semeadas em placas para cultura celular de 6 poços (1×10^5 células/poço) contendo 3 mL de solução teste, e mantidas por 24 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2. Após o período, foram realizados os tratamentos dos controles negativos, do controle positivo cisplatina (500 µg/mL) e 7 concentrações do Ery (35, 87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L). Os testes foram realizados em triplicatas independentes e cada tratamento foi realizado com 3 repetições, sendo 1 poço por repetição (n=3×3 poços/tratamento). As placas foram mantidas por 24 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2.

Após 24 h de exposição aos tratamentos, as células foram lavadas com tampão PBS e desprendidas da placa com tripsina-EDTA (0,1% em tampão PBS). As células foram centrifugadas (1.500 rpm, 5 min, 25ºC), ressuspendidas em tampão PBS gelado e novamente centrifugadas (1.500 rpm, 5 min, 4ºC). O precipitado foi ressuspendido em 100 µL de anexina V 1% em tampão de ligação (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, HEPES 100 mM, pH 7,4), transferido para tubos de citometria, e incubado por 15 min em gelo. Após o período de incubação, foi adicionado 100 µL de iodeto de propídio (PI) 5 µg/mL em tampão de ligação (v/v) e a leitura foi imediatamente realizada em citômetro de fluxo (BD FACSCanto™, BD, EUA).

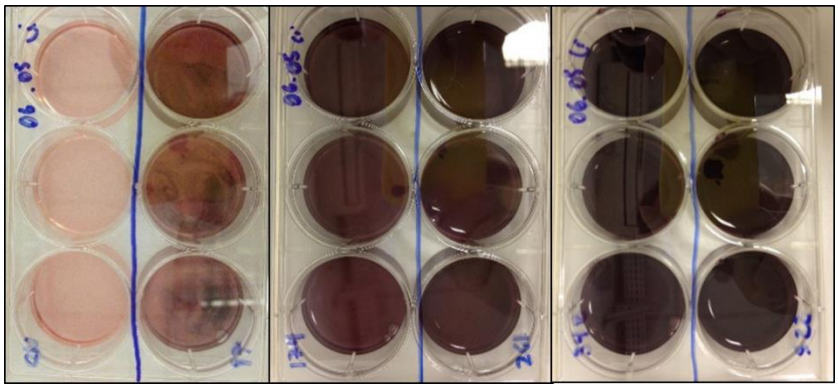
6.4.4.3 Teste do ciclo celular

Testes do ciclo celular foram realizados de acordo com Crissman e Steinkamp (1973) e Braylan et al. (1982), para quantificar as células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular. O teste de ciclo celular baseia-se na marcação do DNA celular com intercalante PI, o qual emite

fluorescência vermelha. Células nas fases de mitose (G2/M) emitem o dobro de fluorescência do que aquelas em fase de crescimento celular (G1), e células em fase de duplicação de DNA (S) emitem fluorescência intermediária. As células foram semeadas em placas para cultura celular de 6 poços (1×10^5 células/poço) contendo 3 mL de solução teste, e mantidas por 24 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2. Após o período, foram realizados os tratamentos dos controles negativos, do controle positivo cisplatina (500 µg/mL) e 5 concentrações do Ery (87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L) (Figura 40). Os testes foram realizados em triplicatas independentes, e cada tratamento foi realizado com 3 réplicas, sendo 1 poço por réplica (n=3×3 poços/tratamento). As placas foram mantidas por 24 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2.

Após 24 h de exposição aos tratamentos, as células foram lavadas com tampão PBS e desprendidas das placas com tripsina-EDTA (0,1% em tampão PBS). As células foram centrifugadas (1.500 rpm, 6 min, 25ºC), ressuspendidas em tampão PBS gelado e novamente centrifugadas (1.500 rpm, 6 min, 4ºC). O precipitado foi ressuspendido em 100 µL de tampão PBS e 2 mL de etanol 70% gelado, e incubado por 24 h a −20ºC. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (1.500 rpm, 4 min, 25ºC), ressuspendidas em 1 µL de RNase 0,3% em PBS gelado (v/v) e incubadas por 30 min no escuro, em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2. Após o tempo de incubação, as amostras foram resfriadas e acrescentadas a 164 µL de *High Fluorescence Solution* (HFS) (citrato de sódio 0,1%, Triton 0,1%, PI 5 µg/mL), transferidas para tubos de citometria, e incubadas por 1 h em gelo. A leitura foi imediatamente realizada em citômetro de fluxo (BD FACSCanto^{TM}, BD, EUA).

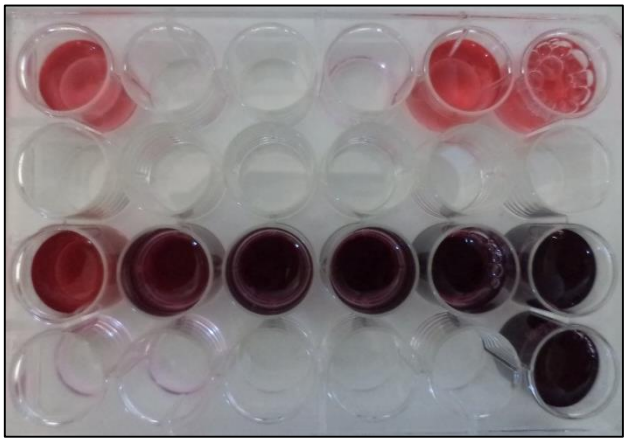
Figura 40. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery) em placas para cultura celular de 6 poços, durante 24 h. Da esquerda para direita: controle negativo, 87, 174, 261, 348 e 522 mg/L de Ery.



6.4.4.4 Genotoxicidade pelo ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com Östling e Johanson (1984) com adaptações de Singh et al. (1988) para detectar lesões no DNA, quantificadas pela intensidade de fragmentos de DNA migrados durante a corrida eletroforética, após a sua desnaturação. As células foram semeadas em placas para cultura celular de 24 poços (2×10^5 células/poço) contendo 2 mL de solução teste, e mantidas por 24 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2. Após o período, foram realizados os tratamentos dos controles negativos, do controle positivo metil metanosulfonado (20 µM) e 7 concentrações do Ery (35, 87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L) (Figura 41). Os testes foram realizados em triplicatas independentes, e cada tratamento foi realizado com 1 repetição (n=3). As placas foram mantidas por 4 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2.

Figura 41. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery). Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle positivo, controle negativo, 35, 87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L de Ery.



Após 4 h de exposição aos tratamentos, as células foram lavadas com tampão PBS e desprendidas da placa com tripsina-EDTA (0,1% em tampão PBS). As células foram centrifugadas (1.500 rpm, 5 min, 25ºC) e ressuspendidas em 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*UltraPure*™ *Low Melting Point*, 0,5% em água ultrapura) a 37ºC. A viabilidade celular dos tratamentos e dos controles foi avaliada em 20 µL da suspensão celular pelo método de exclusão com o corante Azul de Tripano (0,25% em tampão PBS). Lâminas previamente pré-gelatinadas com agarose normal (*UltraPure*™ *Agarose* 1,5% em tampão PBS) receberam 75 µL da suspensão celular. As lâminas foram cobertas com lamínulas para a distribuição das células por toda a área laminar, e foram mantidas a 4ºC por 10 min. Após o enrijecimento da agarose de baixo ponto de fusão, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas

em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10% e Triton X-100 1%, pH 10) por 2 h a 4ºC. Após o período, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese preenchida com tampão de eletroforese (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH ≥ 13) e incubadas por 20 min para a desnaturação do DNA. A corrida eletroforética foi realizada na mesma solução, por 20 min a 1 V/cm e 300 mA. Ao terminar, as lâminas foram incubadas em tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 min, e desidratadas em etanol por 5 min.

As lâminas foram coradas com brometo de etídio (20 µg/mL) e examinadas em microscópio de fluorescência (Eclipse E-200, Nikon, Japão) com filtro de excitação de 510-550 nm e filtro de barreira de 570 nm. Os danos no DNA foram quantificados como intensidade de DNA na cauda (*Tail Intensity*), utilizando o software Comet IV (versão 4.3, Perceptive Instruments Ltda). Foram analisados 100 núcleos selecionados aleatoriamente de duas lâminas por tratamento.

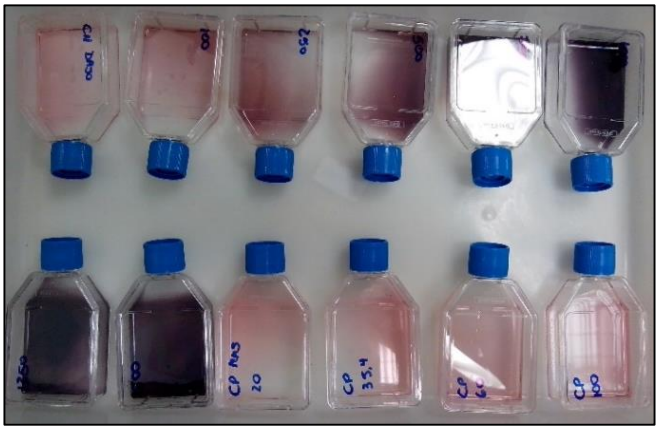
6.4.4.5 Mutagenicidade pelo teste de micronúcleo

Os testes de micronúcleo foram realizados de acordo com Natarajan e Darroudi (1991) adaptado, para verificar o potencial mutagênico. As células foram semeadas em frascos para cultivo celular (25 cm^2) (5×10^5 células/frasco) contendo 5 mL de solução teste, e mantidas em atmosfera úmida por 24 h a 37ºC e 5% de CO_2. Após o período, foram realizados os tratamentos dos controles negativos, do controle positivo metil metanosulfonado (15 µg/mL) e 7 concentrações do Ery (35, 87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L) (Figura 42). Os testes foram realizados em triplicatas independentes e cada tratamento foi realizado com 1 repetição (n=3×1 frasco/tratamento). Os frascos foram mantidos por 20 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2.

Após 20 h de exposição aos tratamentos, as células foram lavadas com tampão PBS e incubadas com 50 µL de citocalasina B (3 µg/mL em meio de cultivo) em 5 mL de meio de cultivo por 28 h a 37ºC para bloquear a citocinese e gerar um acúmulo de células binucleadas. Após o período, as células foram lavadas com tampão PBS e desprendidas dos frascos com tripsina-EDTA (0,1% em tampão PBS). As células foram centrifugadas (1.500 rpm, 5 min, 25ºC) e ressuspendidas durante 5 min em 5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio gelada (1% em água ultrapura, m/v) para intumescer as células e facilitar a visualização de micronúcleos. A interrupção do entumescimento foi realizada com a adição de 20 µL de

formaldeído. As células foram centrifugadas (1.500 rpm, 5 min, 25ºC) e o precipitado foi fixado com 5 mL de solução de metanol/ácido acético (3:1 v/v). As células foram novamente centrifugadas (1.500 rpm, 5 min, 25ºC) e 50 µL do precipitado foi adicionado à lâmina previamente lavada e coberta com filme de água.

Figura 42. Exposição de células da linhagem HepG2 ao eritrostominona (Ery). Da esquerda para direita, de cima para baixo: controle negativo, 35, 87, 174, 261, 348, 435 e 522 mg/L de Ery e controles positivos.



As lâminas foram coradas com laranja de acridina (0,01 g/mL em tampão PSB) e analisadas em microscópio óptico (Eclipse E-200, Nikon, Japão). O potencial mutagênico foi quantificado pela frequência de micronúcleos (MN) em 1.000 células binucleadas (BN) e pela frequência de células BN com MN em 1.000 células (mononucleadas, binucleadas, trinucleadas ou tetranucleadas). O Índice de Divisão Nuclear (IDN) também foi calculado. Os critérios para contagem das células foram membranas plasmáticas e núcleos intactos, e MN com morfologia e coloração idênticas aos núcleos principais, com diâmetro de 1/16 a 1/3 dos núcleos principais, de acordo com Fenech (2007).

6.4.5 Exposição e ensaios em Epiderme Humana Equivalente (EHE)

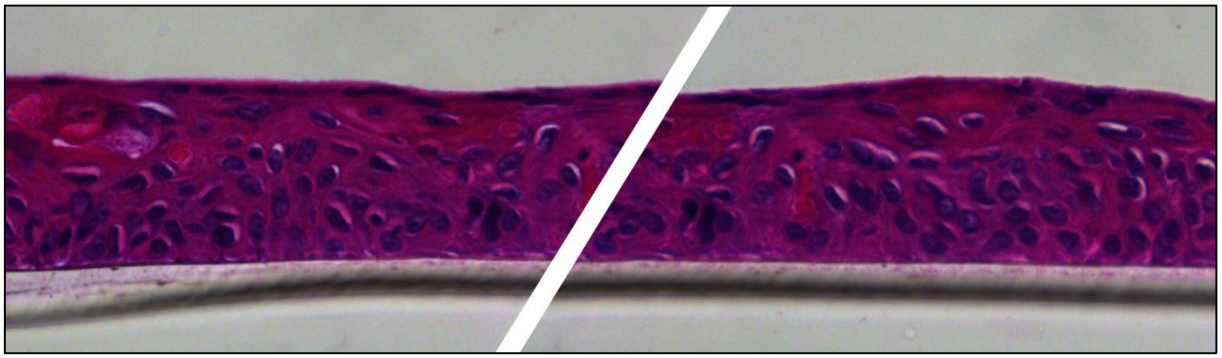
Ao atingirem 80% de confluência, as HaCaT foram semeadas em insertos de cultura Corning Transwell® (2,5 × 10^5 células/inserto em 1 mL de meio de cultivo) previamente revestidos com colágeno IV (0,03 mg/mL em meio de cultivo sem SBF, v/v), e alocados em placas para cultura celular de 12 poços. As placas foram mantidas por 48 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2.

Nas etapas subsequentes, foi utilizado o meio de cultivo DMEM e HAM (3:1, v/v) suplementado com insulina 5 µg/mL, hidrocortisona 0,4 µg/mL, apotransferrina 5 µg/mL, toxina colérica 0,1 nM, TGF-α 2 ng/mL, EGF 1 ng/mL e 5% de meio de cultivo condicionado de culturas de HFF-1 com 80% de confluência. Após o período de incubação, os insertos foram transferidos para placas de 6 poços *deep well* (Corning® BioCoat) contendo 9 mL de meio de cultivo e as células foram mantidas em interface ar-líquido sobre cell strainer de 100 µm (Figura 43). As placas foram mantidas por 13 dias em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2. Ao atingirem o 13º dia, as placas foram transferidas para incubadora com baixa umidade a 37ºC e 5% de CO_2, e foram mantidas até o 16º dia. O meio de cultivo foi substituído a cada 2 dias. Ao final, as análises histológicas (Figura 44) foram realizadas em parceiria com o Laboratório de Histotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), USP.

A exposição das EHE foi realizada topicamente, com a adição do Ery diretamente sobre a EHE para os testes de MTT e em solução de acetona para os ensaios do cometa. Os controles negativos e positivos foram selecionados de acordo com os ensaios realizados.

Figura 43. Inserto com epiderme sobre *cell strainer* (100 µm) em placa de 6 poços *deep well* (Corning® BioCoat).

Figura 44. Estrutura estratificada da epiderme humana equivalente (EHE) construída com queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) sobre membrana do inserto. Análise histológica em cortes de parafina (8 µm, coloração H.E.). Aumento de 40×.



6.4.5.1 Citotoxicidade pelo teste de MTT

Testes de MTT foram realizados de acordo com a OECD *Guideline* 439 (2015) adaptada, para quantificar a capacidade dos queratinócitos em converter o MTT em sal de formazan e, consequentemente, a viabilidade celular. As EHE foram transferidas para placa para cultivo celular de 12 poços contendo 2 mL de meio de cultivo a 37ºC cada poço. Foram realizados os tratamentos do controle negativo em tampão PBS (26 µL/cm^2), do controle positivo dodecil sulfato de sódio (5% em água estéril, 26 µL/cm^2) e do Ery (26 mg/cm^2) com o auxílio de uma espátula curva (Figura 45). Adicionalmente, foi realizado o tratamento do controle de cor não específica (CNE) com o Ery, sendo posteriormente incubado com meio de cultivo em vez de solução de MTT. Nos tratamentos com o Ery, as EHE foram umidificadas com tampão PBS (26 µL/cm^2) antes da aplicação para uma melhor adesão do sólido sobre a EHE. Os testes foram realizados em triplicatas independentes, e cada tratamento foi realizado com 3 repetições, sendo 1 EHE por repetição (n=3×3 EHE/tratamento), exceto o CNE com 1 repetição.

Figura 45. Tratamento tópico das epidermes humanas equivalentes. A: controle negativo com 26 µL/cm^2 de tãmpão PBS. B: tratamento com 26 µg/cm^2 de eritrostominona. C: modelos expostos aos tratamentos.

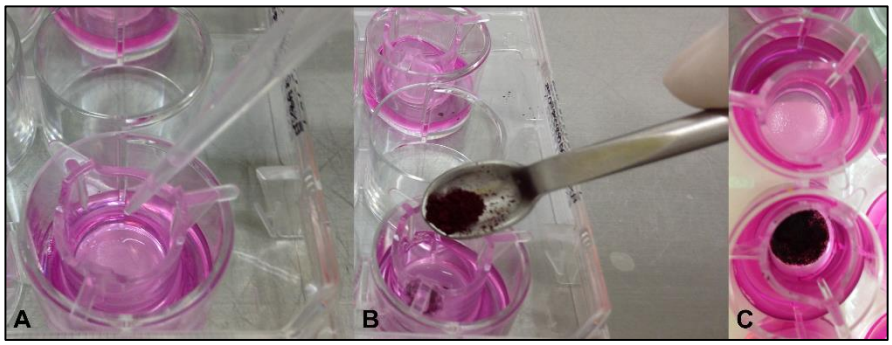
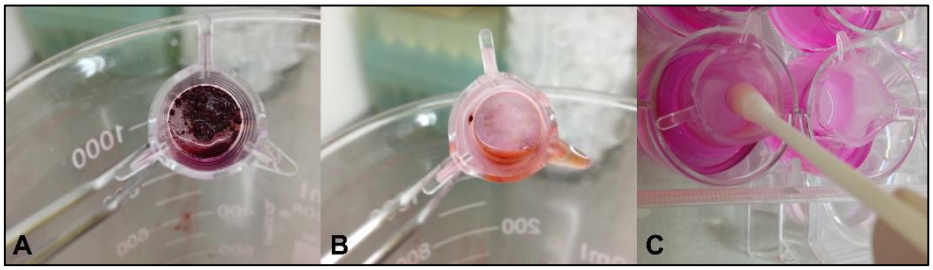


Figura 46. Lavagem das epidermes humanas equivalentes após 15 min de exposição aos tratamentos. A e B: modelos lavados com tampão PBS e acetona. C: Secagem com swab.



Após 15 min de exposição, as EHE foram lavadas 3 vezes com 1 mL de acetona, seguida de 20 lavagens com 1 mL de tampão PBS com o auxílio de uma pipeta dispensadora de volume fixo acoplada a seringa de 50 mL e secas em papel filtro e swab estéril (Figura 46). As aplicações dos tratamentos foram realizadas com 1 min de intervalo entre cada EHE, para que a lavagem dos tratamentos fosse realizada a tempo.

De acordo com a OECD *Guideline* 439 (2015), as EHE devem ser incubadas meio de cultivo por 42 h após a exposição e lavagem dos modelos, para que as células possam se recuperar de efeitos citotóxicos leves e para o aparecimento de efeitos citotóxicos irreversíveis, fundamentais na classificação da substância em irritante (viabilidade celular < 50%) ou não-irritante (viabilidade celular > 50%). Todavia, em nossos testes preliminares, o corante não foi totalmente retirado da superfície da EHE após as lavagens com tampão PBS, o que prolongou a exposição parcial por mais 42 h e inviabilizou o teste (Figura 47). Desta forma, adaptamos a *Guideline* e avaliamos somente os efeitos citotóxicos causados pelo Ery no tempo de 15 min de exposição. Portanto, após a incubação, as EHE foram diretamente transferidas para placas de cultura celular de 12 poços contendo 2 mL de MTT (1 mg/mL em meio de cultivo) e incubadas por 3 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2. Em seguida, as EHE foram lavadas em tampão PBS e secas com papel filtro. O sal de formazan foi extraído com a transferência das EHE para placas para cultura celular de 12 poços contendo 2 mL de isopropanol em cada poço e 1 mL de isopropanol no interior dos insertos. As placas foram vedadas com *Parafilm M*® e incubadas *overnight* no escuro em agitador automático (aproximadamente 120 rpm).

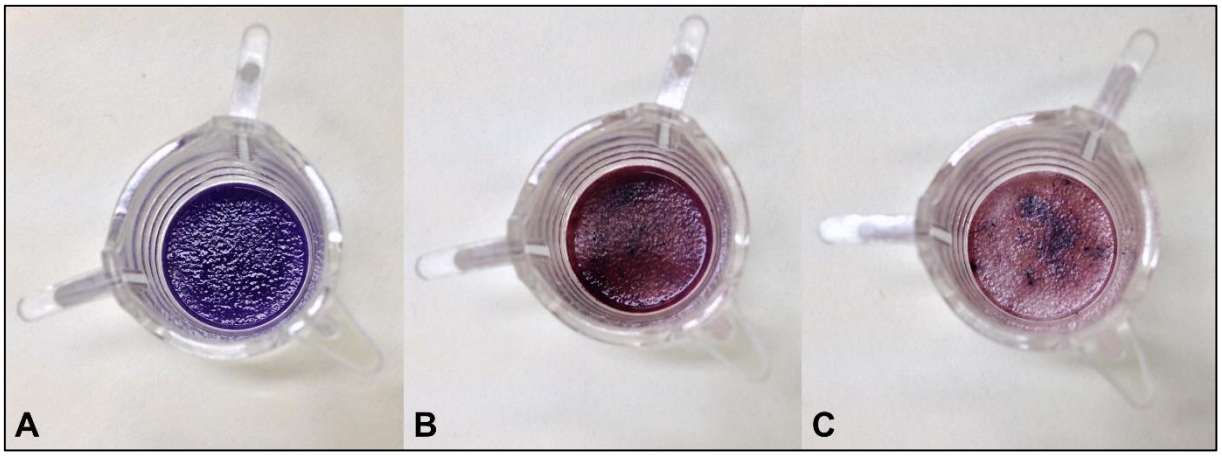
No dia seguinte, os insertos foram furados com agulhas descartáveis (20 × 0,9 mm) para permitir a passagem do isopropanol do interior dos insertos para os poços, e descartados. Foram transferidos 200 µL de isopropanol (branco) e 200 µL de cada solução de extração homogeneizada para placas para cultura celular de 96 poços, e imediatamente determinada a leitura espectrofotométrica em quadruplicata a 570 e 600 nm, para verificar interferências do corante na cor, utilizando leitor de microplaca (Shimadzu RF-5301pc spectrofluorimeter).

A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com as absorbâncias do controle negativo e dos tratamentos com Ery:

$$\%\ Células\ viáveis = \frac{A_t}{A_c} \times 100$$

onde A_t corresponde a absorbância média do tratamento, e A_c a do controle negativo.

Figura 47. Epidermes humanas equivalentes após a incubação ao MTT. A lavagem insuficiente dos modelos após a exposição ao eritrostominona, seguida da incubação por 42 h e incubação com o MTT, causou a exposição prolongada ao corante e inviabilizou o teste. A: controle negativo com tampão PBS. B: exposição ao Ery (20 lavagens com tampão PBS). C: exposição ao Ery (4 lavagens com acetona + 20 lavagens com tampão PBS).



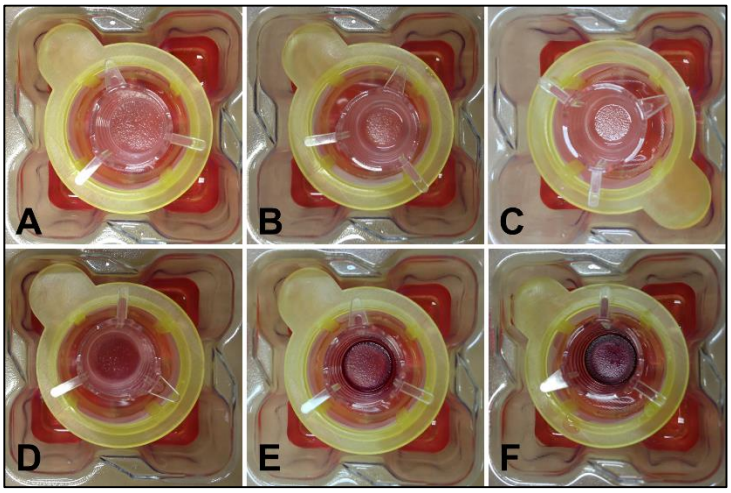
6.4.5.2 Genotoxicidade pelo ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com Reus et al. (2013), para detectar lesões no DNA. As EHE foram transferidas para placa para cultura celular de 12 poços contendo 2 mL de meio de cultivo a 37ºC cada poço. Foram realizados os tratamentos do branco (sem tratamento), do controle negativo com acetona (16 µL/cm^2), do controle positivo metil metanosulfonado (5 µg/cm^2 em 16 µL tampão PBS/cm^2) e do Ery (1, 10 e 100 mg/mL em 16 µL acetona/cm^2) (Figura 48). Os testes foram realizados em triplicadas independentes, e cada tratamento foi realizado com 1 repetição (n=3). As placas foram mantidas em atmosfera úmida por 3 h em atmosfera úmida a 37ºC e 5% de CO_2.

Após 3 h de exposição aos tratamentos, as EHE foram submergidas em 5 mL de tampão PBS por 15 min em placas de cultura celular de 12 poços, e em 5 mL de 0,1% EDTA em tampão PBS (p/v) por mais 15 min. Em seguida, as EHE foram removidas dos insertos com o auxílio de um bisturi e um forceps, e incubadas em tripsina 0,25%, EDTA 0,1% (1 mL no poço e 0,5 mL no interior do inserto) por 15 min a 37ºC. Após o período, as enzimas foram inativadas com meio de cultivo suplementado com 10% de SBF, e as soluções foram homogeneizadas 8 vezes com pipeta Pasteur para o isolamento das células. O conteúdo foi filtrado (*cell strainer* de 40 µm) e centrifugado (1.000 rpm, 5 min, 25ºC). O precipitado foi ressuspendido em 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*UltraPure*^{TM} *Low Melting Point*, 0,5% em água ultrapura) a 37ºC. A viabilidade celular dos tratamentos e dos controles foi avaliada em 20 µL da suspensão

celular pelo método de exclusão com o corante Azul de Tripano (0,25% em tampão PBS). Lâminas previamente pré-gelatinadas com agarose normal (*UltraPure*^{TM} *Agarose* 1% em tampão PBS) receberam 70 µL da suspensão celular. As lâminas foram cobertas com lamínulas para a distribuição das células por toda a área laminar, e foram mantidas a 4ºC por 10 min. Após o enrijecimento da agarose de baixo ponto de fusão, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e Triton X-100 1%, pH 10) *overnight* a 4ºC.

Figura 48. Exposições das epidermes humanas equivalentes aos tratamentos. A: branco. B: controle negativo com 16 µL/cm^2 de acetona. C: controle positivo com 5 µg/cm^2 metil metanosulfonado. D: 1 mg/mL de eritrostominona. E: 10 mg/mL de eritrostominona. F: 100 mg/mL de eritrostominona.



No dia seguinte, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese preenchida com tampão de eletroforese (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH ≥ 13) e incubadas por 20 min para a desnaturação do DNA. A corrida eletroforética foi realizada na mesma solução, por 30 min a 1 V/cm e 300 mA. Ao terminar, as lâminas foram incubadas em tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 min e desidratadas em etanol por 5 min. As lâminas foram coradas com brometo de etídio (20 µg/mL) e examinadas em microscópio de fluorescência (Eclipse E-200, Nikon, Japão) com filtro de excitação de 510-550 nm e filtro de barreira de 570 nm. Os danos no DNA foram quantificados como intensidade de DNA na cauda (*Tail Intensity*), utilizando o software Comet IV (versão 4.3, Perceptive Instruments Ltda). Foram analisados 100 núcleos selecionados aleatoriamente de três lâminas por tratamento.

6.4.6 Análises Estatísticas

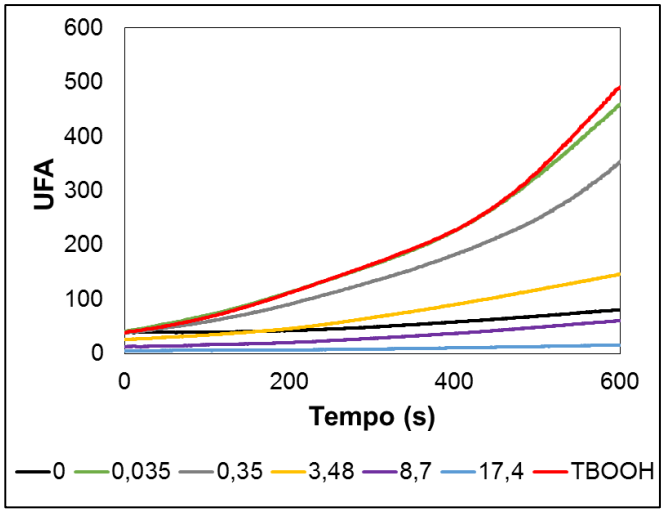
Após verificar a distribuição e variância dos dados (normalidade e homocedasticidade) com os testes de Shapiro-Wilk and Levene Median, respectivamente, One-way ANOVA foi aplicada para dados do modelo HepG2, seguido do teste de Dunnett (nível de significância de 5%) para verificar diferenças significativas entre os tratamentos e os respectivos controles negativos, e test *t* (nível de significância de 5%) para verificar diferenças entre as médias dos tratamentos e controles dos dados de EHE. No caso da normalidade e/ou homocedasticidade falhar, foi aplicada ANOVA on ranks (Kruskall-Wallis). Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA), e os valores de Concentração de Efeito Observado (CEO) foram definidos.

6.5 Resultados

6.5.1 Proteção ao estresse oxidativo

Os resultados mostraram que o Ery reduziu a formação de DCF no interior das mitocôndrias, de forma diretamente proporcional à concentração de EROs no interior da mitocôndria (Figura 49). Portanto, o Ery possui a capacidade de proteger as mitocôndrias dos danos oxidativos gerados pelas EROs.

Figura 49. Efeito de proteção ao estresse oxidativo do eritrostominona (Ery) em mitocôndrias expostas a 300 µmol/L de t-butil-hidroperóxido (t-BOOH). O t-BOOH foi adicionado em todos os tratamentos, exceto no branco (0), para avaliar a capacidade de proteção do eritrostominona. Tratamentos das mitocôndrias com a adição do Ery (mg/L). UFA: unidades arbitrárias de fluorescência.



6.5.2 Viabilidade celular

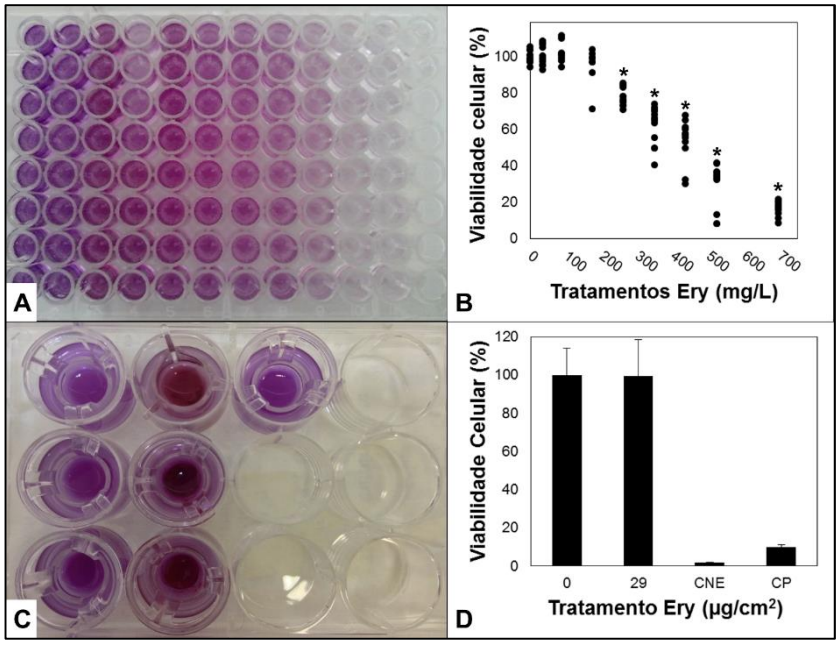
Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para HepG2 e EHE expostas ao Ery estão apresentados na Tabela 11. Especificamente sobre o modelo HepG2, os resultados mostraram que o Ery reduziu significativamente a viabilidade celular em 24% em concentrações a partir de 261 mg/L (Figura 50A e B), apresentando 3-h CE_{50} de 413,69 mg/L (386,75−442,50). Por outro lado, o Ery não reduziu a viabilidade celular de EHE na concentração de 26 µg/cm^2 (Figura 50C e D).

Tabela 11. Valores da CEO (mg/L) e resultados da ANOVA do eritrostominona (Ery) para a linhagem celular HepG2.

Teste	Parâmetro	Ery			
		CEO	CE_{50}	ANOVA	
MTT					
HepG2	Viabilidade	261	413,69 (386,75−442,50)	$F_{(8;93)}$=99	p<0,0001
EHE	celular	−	−	$t_{(16)}$=0,07	p=0,4725
Anexina V / PI					
	Necrose	−	−	$F_{(8;72)}$=0,86	p=0,5551
	Apoptose	35	−	$F_{(8;60)}$=8,4	p<0,0001
HepG2	Apop+Necr	522*	−	$F_{(8;66)}$=6,0	p<0,0001
	Inviáveis	87	−	$F_{(8;72)}$=8,9	p<0,0001
Ciclo celular					
	Fase G1	87	−	$F_{(5;45)}$=6,7	p=0,0001
HepG2	Fase S	−	−	$F_{(5;51)}$=2,7	p=0,0739
	Fase G2/M	87	−	$F_{(5;51)}$=3,8	p=0,0043
Ensaio do cometa					
HepG2	Quebras do	−	−	$F_{(7;16)}$=1,7	p=0,1729
EHE	DNA	−	−	$F_{(3;8)}$=0,85	p=0,5063
Micronúcleo					
	IDN	261		$F_{(7;16)}$=3,9	p=0,0111
HepG2	f_{MN}	−	−	$F_{(7;16)}$=1,6	p=0,2088
	f_{BN-MN}	−	−	$F_{(7;16)}$=1,9	p=0,1321

−nenhum efeito significativo.

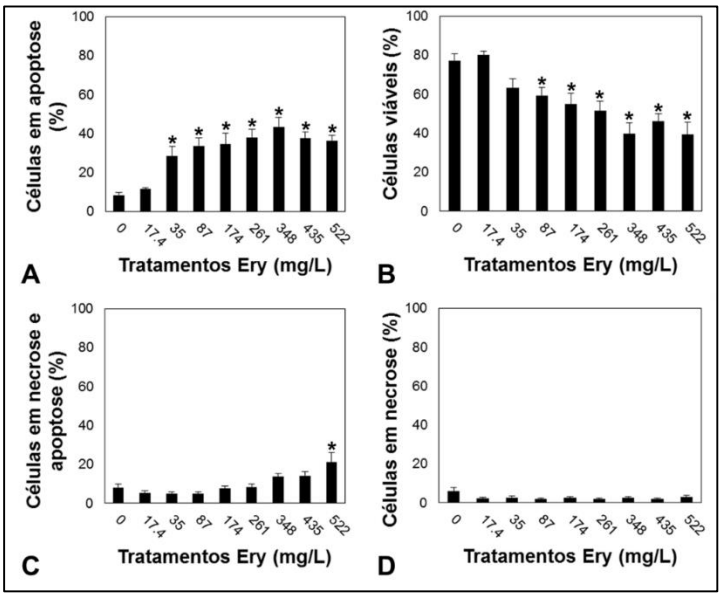
Figura 50. Teste de MTT. A,C: Extração de sais de formazan reduzidos por HepG2 e EHE, respectivamente, expostas ao eritrostominona (Ery). B,D: Viabilidade celular de HepG2 e EHE, respectivamente, expostas ao Ery. B: Valores brutos. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle. D: Valores representados em porcentagem das médias ± desvio padrão. CNE: controle de cor não específica sem adição de MTT; CP: controle positivo.



6.5.3 Morte celular

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para HepG2 expostas ao Ery estão apresentados na Tabela 11. O Ery não induziu processos de necrose isolados (Figura 51A), entretanto, houve um aumento significativo de células em apoptose em concentrações a partir de 35 mg/L (Figura 51B), com a diminuição significativa da viabilidade celular em concentrações a partir de 87 mg/L (Figura 51C), e células em apoptose e necrose simultaneamente aumentaram significativamente na maior concentração testada de 522 mg/L (Figura 51D).

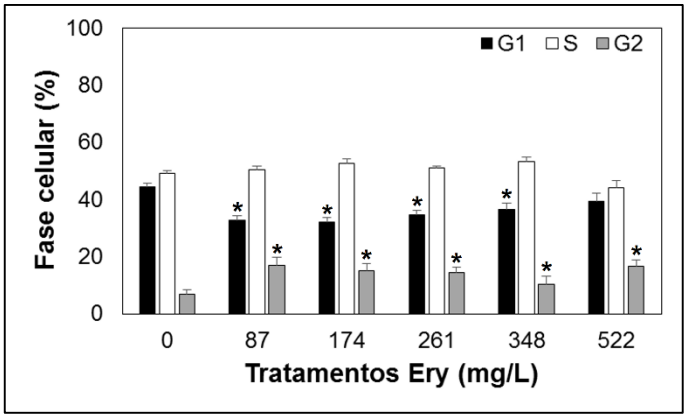
Figura 51. Comparação de células HepG2 expostas ao eritrostominona em (A) necrose, (B) apoptose, (C) viáveis e em (D) necrose e apoptose, pelo teste de anexina V/PI. Valores representados em porcentagem das médias ± erro padrão. *Teste de Dunnett p<0,05, diferença significativa comparada ao controle.



6.5.4 Ciclo celular

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para HepG2 expostas ao Ery estão apresentados na Tabela 11. Em geral, as HepG2 do controle e tratamentos predominaram na fase S, seguida pela fase G1 e G2/M. Houve um aumento significativo na quantidade de células HepG2 expostas ao Ery na fase G2/M, e uma redução na fase G1. Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade de células expostas ao Ery na fase S, comparada ao controle (Figura 52).

Figura 52. Comparação das médias de células HepG2 expostas ao eritrostominona (Ery) nas fases do ciclo celular G1, S e G2/M pelo teste de ciclo celular.Valores representados em porcentagem ± erro padrão.



6.5.5 Genotoxicidade

Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para HepG2 e EHE expostas ao Ery estão apresentados na Tabela 11. O parâmetro selecionado para quantificar os danos foi a intensidade de DNA na cauda (*Tail Intensity*), formada durante a corrida eletroforética (TICE et al., 2000). O Ery não induziu efeitos genotóxicos significativos em todos os tratamentos realizados na HepG2 e na EHE, comparados aos respectivos controles (Figura 53 e Figura 54).

Figura 53. Comparação das médias de intensidade de DNA na cauda (*Tail intensity*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 (A) e epiderme humana equivalente (B) expostas ao eritrostominona (Ery).

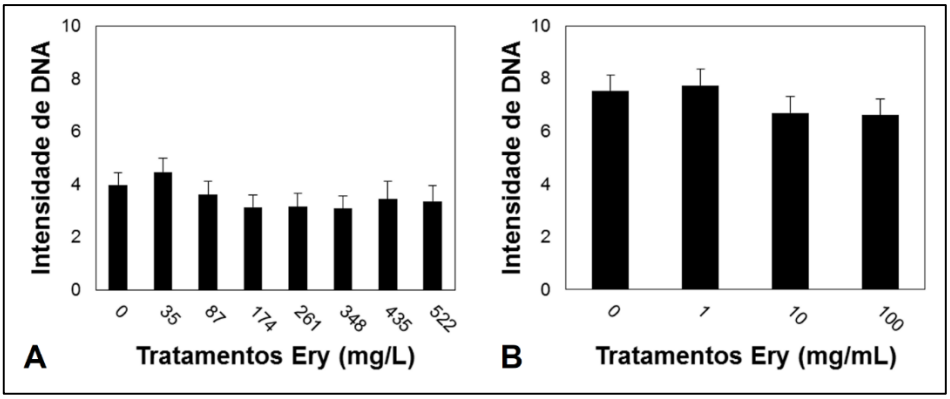
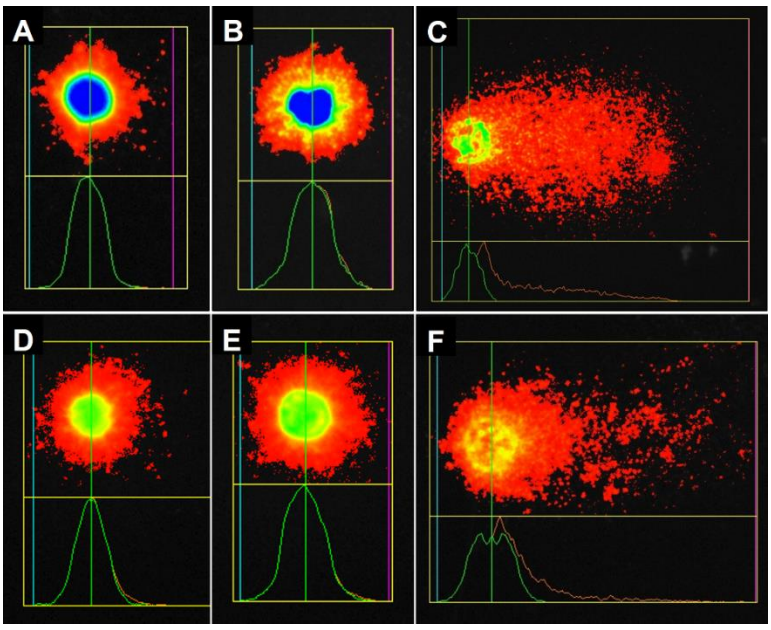


Figura 54. Migração do DNA no ensaio do cometa. Quantificação do DNA na cabeça e cauda dos núcleos em células HepG2 (A-C) e epidermes humanas equivalentes (D-F). A,D: controles negativos em DMSO (1% em meio de cultivo) e acetona, respectivamente. B,E: modelos expostos a 522 mg/L e 10 mg/mL de eritrostominona, respectivamente. C,F: controles positivos em metil metanosulfonado a 20 µM e 5 µg/cm^2, respectivamente. Quantificação realizada pelo software Comet Assay IV. Aumento 40 ×. Fonte: próprio autor.



6.5.6 Mutagenicidade

O potencial mutagênico foi determinado pela frequência de MN em 1.000 células BNs (f_{MN}), frequência de células BNs com MN em 1.000 células (f_{BN-MN}) (FENECH, 2007). Os valores calculados das CEO e os resultados da ANOVA para HepG2 expostas ao Ery estão apresentados na Tabela 11. O Ery não aumentou significativamente a f_{MN} e f_{BN-MN} em células HepG2, comparadas ao controle (Tabela 12, Figura 55). De acordo com os valores obtidos para o IDN, o corante Ery apresentou resposta citostática a partir da concentração 261 mg/L, onde as células inibiram a multiplicação celular em aproximadamente 40%.

Figura 55. Células HepG2 coradas com laranja de acridina. A: controle negativo, B: 435 mg/L de eritrostominona, C-D: controle positivo. Setas: micronúcleo. Aumento 40 ×. Fonte: próprio autor.

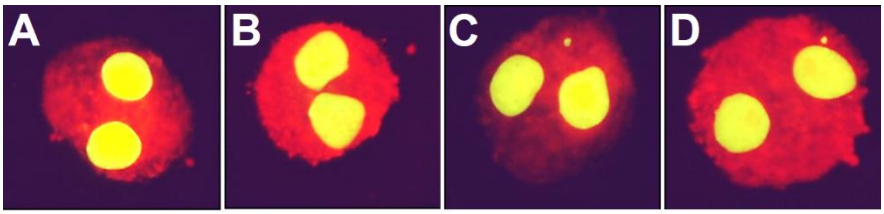


Tabela 12. Comparação das médias (± erro padrão) da frequência de micronúcleo (MN) em mil células binucleadas (BN) (f_{MN}), frequência de células BN com MN (f_{BN-BN}) em mil células, e Índice de Divisão Nuclear (IDN) de células HepG2 expostas ao eritrostominona (Ery).

Ery (mg/L)	f_{MN}	f_{BN-MN}	IDN
0	0,02 ± 0,01	2,00 ± 0,71	1,79 ± 0,13
35	0,02 ± 0,00	1,63 ± 0,46	1,58 ± 0,01
87	0,03 ± 0,01	2,65 ± 0,78	1,66 ± 0,02
174	0,02 ± 0,02	2,30 ± 1,93	1,58 ± 0,01
261	0,02 ± 0,01	1,98 ± 0,63	1,10 ± 0,50*
348	0,04 ± 0,01	3,36 ± 0,77	1,11 ± 0,47*
435	0,02 ± 0,01	2,32 ± 0,71	1,13 ± 0,49*
522	0,03 ± 0,02	3,39 ± 1,94	1,01 ± 0,68*

*Teste de Dunnett $p<0,05$, diferença significativa comparada ao controle.

6.6 Discussão

O corante natural eritrostominona possui potencial aplicação em indústrias como uma alternativa aos corantes sintéticos. O Ery mostrou a capacidade de reduzir a formação de EROs no interior das mitocôndrias, uma característica comum a muitas moléculas antioxidantes da classe das quinonas (KITTAKOOP et al., 1999; XIAO; ZHONG, 2007; KUWAHARA et al.,

2009; ZHOU et al., 2012; ANANTHARAMAN et al., 2014; SILVA et al., 2014). Entretanto, a toxicidade deste corante para células humanas é pouco conhecida. Neste trabalho, toxicidade do Ery foi avaliada para dois modelos, em culturas de hepatócitos de carcinoma humano da linhagem HepG2, e em epiderme humana equivalente (EHE), com morfologia similar ao tecido humano. Foi observado que o Ery é pró-apoptótico para HepG2, mas não induz efeito genotóxico e mutagênico. Por outro lado, o Ery não reduz a viabilidade celular e nem apresenta potencial genotóxico para o modelo EHE nas condições específicas testadas.

A citotoxicidade do Ery foi avaliada por diferentes métodos em HepG2, e os resultados mostraram diferentes respostas. A primeira análise realizada com o teste de MTT indicou a capacidade das HepG2 expostas ao corante em reduzir o MTT em quantidades semelhantes aos controles, efeito diretamente proporcional à quantidade de enzimas desidrogenases mitocondriais viáveis no interior das células. Entretanto, os efeitos pró-apoptóticos do Ery em HepG2 se iniciaram em concentrações até 7,5 vezes abaixo daquelas capazes de diminuir a viabilidade das mitocôndrias desidrogenases. O Ery apresentou efeitos pró-apoptóticos em HepG2 como principal mecanismo de morte celular, com necrose detectada apenas na condição de solução com saturação excedida.

Sabe-se que o processo apoptótico é um mecanismo de morte celular programada das células para manter a homeostase, e o seu desequilíbrio pode ser induzido via extrínseca por estressores extracelulares, ou via intrínseca por sinalizações intracelulares, como o estresse oxidativo (GALLUZZI et al., 2012). Diversos estudos em compostos fenólicos naturais estabeleceram uma relação entre os efeitos pró-oxidantes e a ativação da apoptose via intrínseca. Estes compostos são capazes de induzir o sistema antioxidante endógeno em tecidos normais, entretanto induzem a apoptose em células de rápida proliferação como proteção a danos carcinogênicos (LAUGHTON et al., 1989; OHSHIMA et al., 1998; FENG et al., 2007; WANG; STONER, 2008; LAMBERT, ELIAS, 2010; ANANTHARAMAN et al., 2014). Estas atividades são estimuladas por várias quinonas colorantes naturais, como as antraquinonas aloe-emodina, β-lapachona, *damnacanthal*, *danthron*, emodina e reína, e as naftoquinonas juglona e chiconina (ANANTHARAMAN et al., 2014). Assim, o aumento gradual do número de células apoptóticas em HepG2, uma célula proveniente de carcinoma hepático, pode estar associado ao efeito pró-oxidante específico em células de rápida proliferação, ao contrário do efeito antioxidante em mitocôndrias hepáticas de ratos normais, o que contribuiria para elevar o seu valor agregado. Entretanto, ainda são necessários estudos que elucidem os mecanismos pré- e pró-apoptóticos do Ery em diferentes modelos celulares.

Apesar do potencial pró-apoptótico do Ery, ele não induziu danos no DNA e nem mutações cromossômicas durante a divisão celular de HepG2. Estas respostas se destacam, visto que muitos corantes sintéticos azo apresentam potencial genotóxico e mutagênico para as células HepG2 (CHEQUER et al., 2009; FERRAZ et al. 2011; FERRAZ et al. 2012; ZANONI et al., 2014; TAFURT-CARDONA et al., 2015), dentre eles o BR51, que induz danos genotóxicos e mutagênicos em concentrações extremamente abaixo das utilizadas pela indústria de cosméticos em formulações de tinturas de cabelo (ZANONI et al., 2014; TAFURT-CARDONA et al., 2015). Corantes sintéticos de outras classes que não a azo também apresentam potencial genotóxico e mutagênico para HepG2, como o eritrosina B, um derivado de fluorona utilizado em indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias (CHEQUER et al., 2012). Estes efeitos adversos caracterizam o perigo de muitos corantes sintéticos à saúde humana, especialmente aqueles com a estrutura nitroaromática na molécula que induzem modificações no DNA (KILINC; KILINC, 2005; TAFURT-CARDONA et al., 2015).

O Ery também mostrou ser um bloqueador da divisão celular das HepG2, sem alterar a síntese de DNA. Ele causou um acúmulo de células em fase de mitose e G2, intervalo entre a duplicação do DNA e a mitose, o que gerou um atraso na quantidade de células em fase de crescimento com elevada taxa metabólica devido à grande quantidade de proteínas e enzimas sintetizadas (GARRETT et al., 2001). Este acúmulo de células na mitose e redução de células em crescimento demonstra que as células reduziram a proliferação e, consequentemente, causou um atraso no ciclo celular, uma resposta característica de células em condições de estresse e diretamente relacionada a um aumento de morte celular (PIETENPOL; STEWART, 2002). Em concentrações elevadas, o Ery reduziu a proliferação celular de HepG2 quantificada pelo ensaio do micronúcleo. Entretanto, considerando que os dados do ensaio do micronúcleo são obtidos pela contagem visual de células em microscópio óptico, as análises do ciclo celular baseadas na marcação estequiométrica do DNA celular com o intercalante PI mostraram ser mais sensíveis, uma vez que as respostas correspondem a quantidade de DNA presente na célula (BERTOLI et al., 2013).

Considerando a toxicidade para o modelo de EHE, o Ery não foi citotóxico e nem apresentou potencial genotóxico para as células da epiderme após exposições de curta duração que detectam efeitos citotóxicos, porém passíveis de reparo. Os possíveis efeitos irreversíveis causados pela irritação cutânea não foram quantificados devido à incompatibilidade do corante ao método descrito (OECD *Guideline* 439, 2015), uma vez que o Ery não foi totalmente removido da superfície da epiderme após sucessivas lavagens. A limitada variedade de

solventes que podem ser aplicados sobre a epiderme humana reconstruída ou equivalente sem alterar a sua integridade dificulta a aplicação e remoção de substâncias hidrofóbicas dispersas em solventes orgânicos.

Além disso, de acordo com as análises morfológicas da EHE, o estrato córneo apresentou falhas na sua formação, o que pode ter favorecido a rápida penetração do corante, com difícil remoção após as lavagens. Durante o período de interface ar-líquido, os aspectos macroscópicos da superfície epitelial mudaram gradativamente para uma aparência seca e opaca. Entretanto, histologicamente, os queratinócitos formaram uma fica camada do estrato córneo sobre o estrato granuloso. O estrato córneo, em particular, tem a importante função de barreira após a diferenciação terminal dos queratinócitos, sendo formado por células desprovidas de núcleo acumuladas na última camada da epiderme. Embora existam resultados promissores com uso de linhagens não primárias na construção de epidermes, a estratificação das HaCaT para formar o epitélio corneificado ainda é limitada (BOELSMA et al., 1999; SCHOOP et al, 1999; STARK et al. 2004; BROHEM et al., 2010; BOROWIEC et al., 2013; LABOUTA et al, 2013; OKUGAWA; HIRAI, 2013; MATHES et al., 2014; JUNG et al. 2016).

6.7 Conclusão

Nossos resultados mostraram que o corante natural Ery tem capacidade antioxidante para mitocôndrias hepáticas de rato, mas é pró-apoptótico para as células de hepatocarcinoma humano (HepG2). O efeito é acompanhado por um atraso no ciclo celular, em particular na fase da mitose (G2/M), reduzindo a proliferação celular. Por outro lado, o Ery não apresentou potencial genotóxico e mutagênico para estas células nas condições testadas. Adicionalmente, não foram observados efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade em modelo de epiderme humana 3D construído à partir de células imortalizadas de queratinócitos humanos (HaCaT). Em síntese, nós concluímos que o Ery pode ser um composto com aplicabilidade industrial, entretanto, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos e vias de sua capacidade antioxidante e pró-apoptótica.

Capítulo

07

DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 DISCUSSÃO GERAL

Os corantes sintéticos são amplamente distribuídos por todo o mundo, no entanto, suas propriedades tóxicas permanecem mal compreendidas para o ambiente, o que gera preocupações como contaminantes emergentes. Assim, a busca por corantes naturais menos tóxicos tem aumentado. Neste trabalho, nós mostramos que o corante natural Ery, um composto de coloração vermelha extraído de fungos com potencial aplicabilidade em indústrias, e o corante azo sintético BR51, um composto com comprovado potencial genotóxico e mutagênico para os humanos (EU SCCS/1436/11, 2011; ZANONI et al., 2014; TAFURT-CADORNA et al., 2015), são tóxicos para os organismos aquáticos *D. magna* e zebrafish.

Em síntese, os corantes Ery e BR51 reduziram o consumo de energia em embriões de zebrafish em níveis bioquímicos, o qual foi associado à diminuição na atividade locomotora das larvas e às alterações morfológicas observadas no saco vitelínico de maior tamanho, possivelmente devido a uma deformidade ou atraso na absorção do vitelo (ABE et al., 2017a). Apesar da menor quantidade de energia consumida, os embriões elevaram a atividade do sistema de detoxificação, o qual é metabolicamente custoso (ABE et al., 2017b). Do ponto de vista ecológico, o desequilíbrio energético indica uma condição de estresse que resulta em uma resposta adaptativa às taxas metabólicas e permite a manutenção basal e sobrevivência dos organismos (SOKOLOVA et al., 2012). Esta desaceleração metabólica permite que os organismos sobrevivam, no entanto, outras funções fisiológicas são comprometidas, sendo esperados os prejuízos no desenvolvimento e na atividade locomotora (MCKEE; KNOWLES, 1986; SMOLDERS et al., 2003).

Apesar das respostas semelhantes entre zebrafish expostos ao BR51 e ao Ery, os mecanismos apresentados foram diferentes. O BR51, por exemplo, reduziu a atividade, a distância e o tempo de natação das larvas durante os estímulos de claro e escuro, indicando sua independência quanto a presença da luz. Por outro lado, o Ery reduziu a atividade, distância e tempo de natação somente nos períodos de escuro, portanto as larvas não alteram a atividade locomotora com o estímulo da luz. Em relação à morfologia dos embriões, o Ery também induziu edemas de saco vitelínico e pericárdio, os quais estão associados a falhas na função da permeabilidade da membranas para o balanço osmótico (HILL et al., 2004; TSURUWAKA et al., 2015) e nas funções renais de zebrafish (HANKE et al., 2013). Os efeitos pró-oxidantes dos corantes também mostraram mecanismos diferentes, o BR51 elevou a atividade enzimática do antioxidante CAT e da GST do sistema de detoxificação, e também os níveis de glutationa,

enquanto o Ery elevou somente a atividade da GST. Entretanto, ambos causaram a peroxidação lipídica, o que evidencia a condição de estresse oxidativo dos embriões.

Em relação ao microcrustáceos *D. magna*, estes organismos apresentaram elevada sensibilidade aos corantes, em particular ao BR51, comparada à sensibilidade do zebrafish (Figura 56). O BR51 reduziu a reprodução (n.º de neonatos) das fêmeas e causou a imobilidade dos neonatos em concentrações até 100-120 vezes menores do que as concentrações do Ery capazes de induzir estes mesmos efeitos. Entretanto, em concentrações baixas, as *D. magna* expostas a ambos os corantes recuperaram o número de neonatos nas ninhadas subsequentes, uma resposta adaptativa às exposições prolongadas que preveniu alterações no crescimento populacional. Em contraste às respostas de redução da atividade locomotora em embriões de zebrafish associadas ao desequilíbrio energético e efeitos pró-oxidantes dos corantes, as *D. magna* aumentaram a atividade locomotora. O Ery aumentou a atividade de natação em *D. magna* com e sem estímulo de luz, enquanto o BR51 aumentou a distância e velocidade de natação somente nos períodos com estímulo de luz, e em concentrações até 200 vezes menores que as do Ery. Além disso, o BR51 também aumentou o consumo de oxigênio das *D. magna*, associado a um aumento na capacidade metabólica dos organismos. Estes resultados indicam que o zebrafish e a *D. magna* possuem sensibilidades diferentes aos corantes e respondem de maneira diferentes aos efeitos tóxicos.

Embora nossos dados apontem para a toxicidade do Ery, este composto é facilmente tratável em efluentes urbanos e industriais. Realizamos um tratamento simples, utilizando luz por 7 dias, e verificamos que o Ery se degrada nesta condição, e o produto formado (EryD) não induziu toxicidade nos organismos testados. A provável degradação estrutural da naftoquinona preveniu e/ou inativou a toxicidade da molécula original, assim como a formação de metabólitos secundários tóxicos para os organismos, destacando o Ery como um possível corante *eco-friendly*. Esta fácil fotodegradação traz algumas vantagens, dentre elas a rapidez, simplicidade e baixo custo para tratamentos de efluentes contendo o corante, quando comparada aos métodos laboriosos e pouco eficientes utilizados em águas residuais contendo corantes azo, como tratamentos fotoelectrocatalíticos, adsorventes e processo fenton-coagulação (FRAGA et al., 2013; FRAGA; ZANONI, 2011; SHARMA et al., 2011; ZHANG et al., 2014).

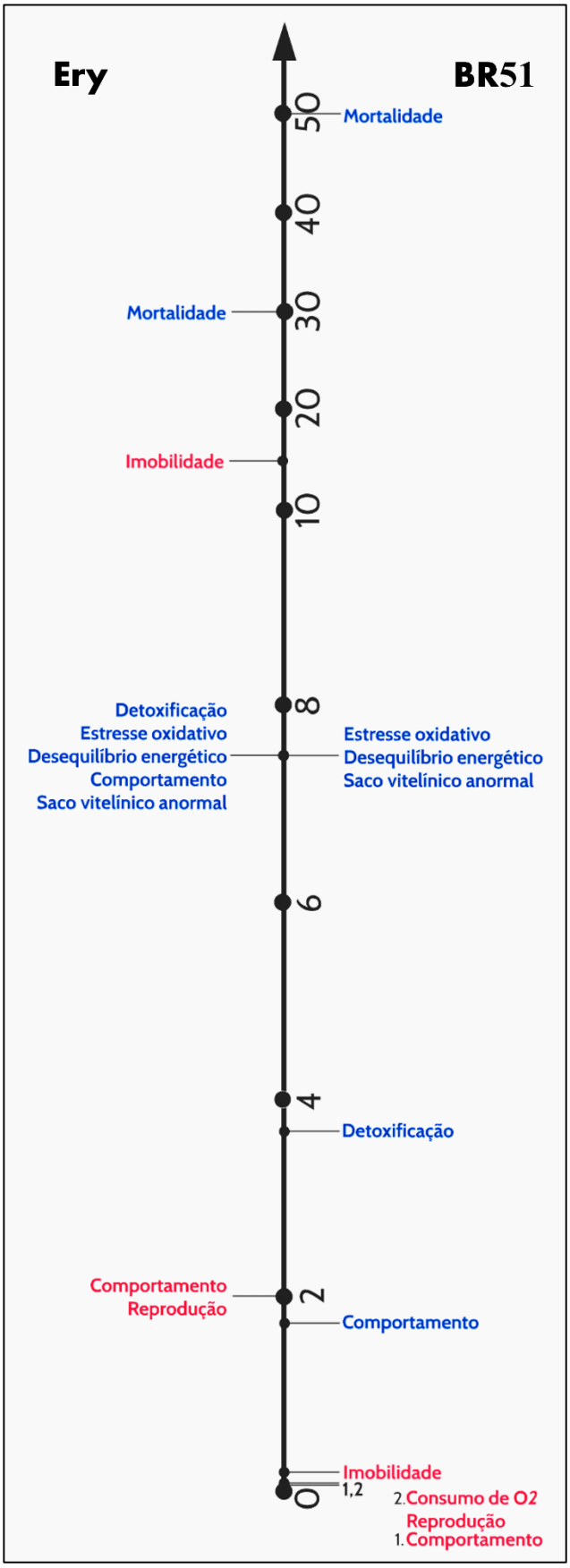
O corante natural Ery também apresentou capacidade de proteção ao estresse oxidativo induzido em mitocôndrias hepáticas de ratos, e não apresentou potencial genotóxico e mutagênico para as linhagens celulares humanas selecionadas, entretanto, causou efeitos pró-

apoptóticos para hepatócitos humanos. Ao contrário dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do BR51 para hepatócitos humanos HepG2 (TAFURT-CADORNA et al., 2015) e para queratinócitos humanos HaCaT (ZANONI et al., 2014), o Ery não apresentou estes efeitos nas mesmas linhagens celulares. Entretanto, o Ery mostrou atividade pró-apoptótica para HepG2, diminuindo a proliferação celular desta linhagem, com um atraso na fase da mitose. Visto que as HepG2 são células originárias de carcinoma, esta linhagem não é o modelo ideal para avaliação da toxicidade de quinonas naturais. Estes compostos são conhecidos pela indução de apoptose em células de carcinoma com rápida proliferação como proteção a danos carcinogênicos (LAUGHTON et al., 1989; OHSHIMA et al., 1998; FENG et al., 2007; WANG; STONER, 2008; LAMBERT, ELIAS, 2010; ANANTHARAMAN et al., 2014). Desta forma, o aumento gradual do número de células apoptóticas em HepG2 pode estar associado a um efeito específico em células de carcinoma, portanto são necessários estudos que elucidem os mecanismos pró-apoptóticos do Ery em diferentes linhagens celulares.

O trabalho realizado nesta tese evidencia a importância da integração de várias ferramentas para uma avaliação toxicológica. Utilizando uma série de experimentos com organismos de diferentes níveis tróficos (microcrustáceos e peixes), e analisando indicadores de diferentes níveis de organizações biológicas, como bioquímicos, celulares e individuais, os resultados obtidos permitem uma extrapolação mais preditiva para efeitos populacionais e o reconhecimento de alguns dos principais mecanismos de toxicidade das moléculas dos corantes, como os efeitos pró-oxidantes e desequilíbrio no balanço energético. Entretanto, as vias pelas quais os corantes atuam podem ser melhor elucidadas com ferramentas adicionais de toxicocinética, e a extrapolação dos efeitos para cenários mais realísticos pode ser complementada com o uso de modelos de ecossistemas, como estudos de campo e mesocosmos. A escolha de diferentes linhagens celulares de diferentes órgão-alvos também propicia uma avaliação mais completa da toxicidade dos corantes para humanos, principalmente com o uso de modelos 3D, visto que estes modelos permitem a avaliação em um ambiente biomimético, e não somente em células isoladas, tornando-os excelentes modelos *in vitro* preditivos. É importante ressaltar que os ensaios realizados são métodos de *screening*, e requerem estudos mais detalhados sobre os mecanismos de toxicidade do Ery.

A Figura apresentada a seguir mostra um resumo dos efeitos tóxicos detectados neste trabalho do corante natural em relação ao corante sintético para os organismos aquáticos.

Figura 56. Resumo dos efeitos adversos induzidos pelo eritrostominona (Ery) e Basic Red 51 (BR51) nos parâmetros avaliados em *Daphnia magna* (vermelho) e nos estágios iniciais de zebrafish (azul). Valores da linha representam concentrações dos corantes (mg/L).



7.2 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 fotoproduto 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.

REFERÊNCIAS

Download more graphics at www.psdgraphics.com

REFERÊNCIAS

ABE, F. R.; GRAVATO, C.; SOARES, A. M. V. M.; OLIVEIRA, D. P. Biochemical approaches to assess oxidative stress induced by exposure to natural and synthetic dyes in early life stages in zebrafish. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2017b, https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1371091.

ABE, F. R.; MENDONÇA, J. N.; MORAES, L. A. B.; OLIVEIRA, G. A. R.; GRAVATO, C.; SOARES, A. M. V. M.; OLIVEIRA, D.P. Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. *Chemosphere*, v. 178, p. 282-290, 2017a, http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.030.

ABE, F. R.; SOARES, A. M. V. M.; OLIVEIRA, D. P.; GRAVATO, C. Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: cellular energy allocation and neurotoxicity. Submetido à *Environmental Pollution*, 2017c.

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.

ALVES, D. S.; PÉREZ-FONS, L.; ESTEPA, A.; MICOL, V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, p. 549-561, 2004, http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.012.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.

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.; KOBA, O.; GIANG, P. T.; SOARES, A. M. V. M.; DOMINGUES, I. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical andbehavioural 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.

BAKER, M. A.; CERNIGLIA, G. J.; ZAMAN, A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical Biochemistry*, v. 190, p. 360-365, 1990, https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90208-Q.

BALDIN, J. C.; MICHELIN, E. C.; POLIZER, Y. J.; RODRIGUES, I.; GODOY, S. H. S.; FREGONESI, R. P.; PIRES, M. A.; CARVALHO, L. T.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; LIMA, C. G.; FERNANDES, A. M.; TRINDADE, M. A.; Microencapsulated jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract added to fresh sausage as natural dye with antioxidant and antimicrobial activity. *Meat Science*, p. 15-21, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.016.

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.; COUTELLEC, 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.

BERTOLI, C.; SKOTHELM, J. M.; BRUIN, R. A. M. Cell cycle-regulated transcription during the G1 and S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 14, p. 518-528, 2013, http://dx.doi.org/10.1038/nrm3629.

BERTRAND, J. Y.; KIM, A. D.; VIOLETTE, E. Y. P.; STACHURA, D. L.; CISSON, J. L.; TRAVER, D. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. Developmental Biology, v. 134, n. 23, p. 4147-4156, 2007, http://dx.doi.org/10.1242/dev.012385.

BHUNIA, F.; SAHA, N. C.; KAVIRAJ, A. Effects of aniline – an aromatic amine to some freshwater organisms. *Ecotoxicology*. v. 12, p. 397-404, 2003, https://doi.org/10.1023/A:1026104205847.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malonyldialdehyde determination. *Methods in Enzymology*, v. 90, p. 105-110, 1984.

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.

BOROWIEC, A. S.; CELCOURT, P.; DEWAILLY, E.; BIDAUX, G. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS One*, v. 8, n. 10, e77507, 2013, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077507.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analysis Biochemical*, v. 72, p. 248-254, 1976, https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

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.

BRAYLAN, R. C.; BENSON, N. A.; NORSE, V.; KRUTH, H. S. Correlated analysis of cellular DNA membrane antigens, and light scatter of human lymphoid cells. *Cytometry*, v. 2, n. 5, p. 337-343, 1982.

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.; BERTOLLETI, 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.

BURKS, R. L.; LODGE, D. M.; JEPPESEN, E.; LAURIDSEN, T. L. Diel horizontal migration of zooplankton: costs and benefits of inhabiting the litoral. *Freshwater Biology*, v. 47, p. 343-365, 2002, http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00824.x.

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.yrtph.2014.05.018.

CAMPOS, B.; ALTENBURGER, R.; GOMEZ, C.; LACORTE, S.; PINÃ, B.; BARATA, C.; LUCKENBACH, T. First evidence for toxic defense based on the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in Daphnia magna. Aquatic Toxicology, v.148, p. 139-151, http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.001.

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.

CESPEDES, C. L.; MUÑOZ, E.; SALAZAR, J. R.; YAMAGUCHI, L.; WERNER, E.; ALARCON, J.; KUBO, I. Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from *Calceolaria talcana* and *C. integrifolia* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae). *Food and Chemical Toxicology*, v. 62, p. 919-926, 2013, http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.027.

CHANGWONG, N.; SABPHON, C.; INGKANINAN, K.; SAWASDEE, P. Acetyl- and Butyryl-cholinesterase inhibitory activities of mansorins and mansonones. *Phytotherapy Research*, v. 26, p. 392-396, 2012, http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3576.

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.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S. OLIVEIRA, D. P. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. *Mutation Research*, v. 676, p. 83-86, 2009, http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.04.004.

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.

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.

CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In CRC handbook of methods in oxygen radical research, Ed. R. A. Greenwald, 283-284. Boca Raton: CRC Press, 1985.

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 a xenobiotics. *Chemosphere*, v. 56, p. 395-404, 2004, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.025.

COSTA, P.; GONÇALVES, S.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; ROMANO, A. Inhibitory effect of *Lavandula viridis* on Fe^{2+}-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties. *Food Chemistry*, v. 126, p. 1779-1786, 2011, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.085.

CRISSMAN, H. A.; STEINKAMP, J. A. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cell from large mammalian cell populations. *The Journal of Cell Biology*, v. 59, p. 766, 1973.

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 tetrazólium 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: príncipes, approaches and perspectives*, v. 2, 2009, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0197-2.

DIAMANTINO, T. C.; ALMEIDA, E.; SOARES, A. M.; GUILHERMINO, L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere*, v. 45, n. 4-5, 553-560, 2001.

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 L358/1, 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.

ECHC. Environment Canada and Health Canada, 2013a. Draft Screening Assessment e Aromatic Azo and Benzidine-based Substance Grouping e Certain Azo Solvent Dyes.

ECHC. Environment Canada and Health Canada, 2013b. Draft Screening Assessment: Aromatic Azo and Benzidine-based Substance Grouping - Certain Azo Disperse Dyes.

ELLMAN, J. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

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 cytome assay. *Nature Protocols*, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLES, 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.

FENG, R.; NI, H. M.; WANG, S. Y.; TOURKOVA, I. L.; SHURIN, M. R.; HARADA, H.; YIN, X. M. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 18, p. 13468-13476, 2007, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M610616200.

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.

FILHO, W. D.; TRIBESS, T.; GÁSPARI, C.; CLAUDIO, F. D.; TORRES, M. A.; MAGALHÃES, A. R. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, v. 203, p. 149-158, 2001, https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00599-3.

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.

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 prophylatics 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.

FRAGA, L.E.; ZANONI, M. V. B. Nanoporous of W/WO3 thin film electrode grown by electrochemical anodization applied in the photoelectrocatalytic oxidation of the Basic Red 51 used in hair dye. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 4, p. 718-725, 2011, http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000400015.

FRAHER, D.; SANIGORSKI, A.; MELLETT, N. A.; MEIKLE, P. J.; SINCLAIR, A. J.; GIBERT, Y. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell Reports*, v. 14, p. 1317-1329, 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.016.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO. L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavoneon selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology Biochemistry*, v. 26, p. 149-156, 2002.

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.

GARRETT, M. D. Cell cycle control and cancer. *Current Science*, v. 81, n. 4, p. 515-522, 2001.

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.

GHS. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. Globally Harmonized System, GHS, New York and Geneva, United Nations, 2009, ST/SG/AC.10/30/Rev.3.

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, 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.

HACHICHO, N.; REITHEL, S.; MILTNER, A.; HEIPIEPER, H. J.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T. Body mass parameters, lipid profiles and protein contents of zebrafish embryos and effects of 2,4-dinitrophenol exposure. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, e0134755, 2015, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0134755.

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.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. *Environmental Science and Technology*, v. 7, p. 714-719, 1977.

HANKE, N.; STAGGS, L.; SCHRODER, P.; LITTERAL, J.; FLEIG, S.; KAUFELD, J.; PAULI, C.; HALLER, H.; SCHIFFER, M. ‘‘Zebrafishing’’ for novel genes relevant to the glomerular filtration barrier. *BioMed Research International*, ID 658270, 2013, http://dx.doi.org/10.1155/2013/658270.

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.2016.08.010.2016.

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.

HENRIQUES, J. F.; ALMEIDA, A. R.; ANDRADE, T.; KOBA, O.; GOLOVKO, O.; SOARES, A. M. V. M.; OLIVEIRA, M.; DOMINGUES, I. Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: a toxicological and behavioral perspective. *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 355-364, 2015, http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.017.

HERBOMEL, P.; THISSE, B.; THISSE, C. Ontogeny and behavior of early macrophages in the zebrafish embryo. *Developmental Biology*, v.126, p. 3735-3745, 1999.

HERBOMEL, P.; THISSE, B.; THISSE, C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Developmental Biology*, v. 238, p. 274-288, 2001, http://dx.doi.org/10.1006/dbio.2001.0393.

HILL, A. J.; BELLO, S. M.; PRASCH, A. L.; PETERSN, R. E.; HEIDEMAN, W. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages. Toxicological Sciences, v.78(1), p.78-87, 2004. http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfh056.

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.

JUNG, M. H.; JUNG, S. M.; SHIN, H. S Co-stimulation of HaCaT keratinization with mechanical stress and air-exposure using a novel 3D culture device. *Scientific Reports*, v. 6, 33889, 2016, http://dx.doi.org/10.1038/srep33889.

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.; WALI, 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.

KILINC, K.; KILINC, A. Mutagenic actions of nitrogen oxides. *Indoor and Built Environment*, v. 14, p. 503-512, 2005, http://dx.doi.org/10.1177/1420326X05060046.

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, 10.1007/s13530-017-0302-8.

KITTAKOOP, P.; PUNYA, J.; KONGSAEREE, P.; LERTWERAWAT, Y.; JINTASIRIKUL, A.; TANTICHAROEN, 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.

KITTAKOOP, P.; PUNYA, J.; KONGSAEREE, P.; LERTWERAWAT, Y.; JINTASIRIKUL, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 453-457, 1999, https://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.

KNOBEL, M.; BUSSER, 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.; REIFFERSCHEID, 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 *Anthocidaris 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.

LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 501, p. 65-72, 2010, http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.013.

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.

LAUGHTON, M. J.; HALLIWELL, B.; EVANS, P. J.; HOULT, J. R. S. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenoltcs quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*, v. 38, n.17, p. 2859-2865, 1989.

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, PartA*, 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). J*ournal of Toxicology and Environmental Health, PartA*, v. 78, p. 466-480, 2015, https://doi.org/10.1080/15287394.2014.999296.

LI, Y.; SHI, J. Q.; QU, R. J.; FENG, M. B.; LIU, F.; WANG, M.; WANG, Z. Y. Toxicity assessment on three direct dyes (D-BLL, D-GLN, D-3RNL) using oxidative stress bioassay and quantum parameter calculation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 86, p. 132-140, 2012, http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.023.

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: na 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-C_{60}, and $C_{60}HxC_{70}Hx$). 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.

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.

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.

MEYER J. S.; INGERSOLL, C. G.; MCDONALD, L. L.; BOYCE, M. S. Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. *Ecology*, v. 67, p. 1156-1166, 1986.

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.

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, http://dx.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.

MOOLMAN, L.; VAN VUREN, J. H. J.; WEPENER, V. Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 68, p. 443-450, 2007, http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.017.

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 EpiDermTM 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/bfgp/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.

NOJAVAN, S.; TAHMASEBI, Z.; BIDARMANESH, T.; BEHDAD, H.; NASIRI-AGHDAM, M.; MANSORI, S.; POURAHADI, A. Electrically enhanced liquid-phase microextraction of three textile azo dyes from wastewater and plant samples. *Journal of Separation Science*, v. 36, p. 3256-3263, 2013, http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201300546.

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.

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.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979, https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3.

OHSHIMA, H.; YOSHIE, Y.; AURIOL, S.; GILIBERT, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 25, n. 9, p. 1057-1065, 1998, https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00141-5.

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.

OKUGAWA, Y.; HIRAI, Y. Extracellular epimorphin modulates epidermal differentiation signals mediated by epidermal growth factor receptor, *Journal of Dermatological Science*, v. 69, p. 236–242, 2013, http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.11.006.

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.

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.

PEDERSEN, P. L.; GREENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. *Methods in Cell Biology*, v. 20, p. 411-481, 1978.

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.

PHYU, M. P.; TANGPONG, J. Protective effect of *Thunbergia laurifolia* (Linn.) on lead induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment in mice. *Biomedical Research*, ID 186098, 2013, http://dx.doi.org/10.1155/2013/186098.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signing: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, v. 181-182, p. 475-481, 2002.

PINHO, B. R.; FERRERES, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, p. 1681-1700, 2013, http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12081.

PRABHAKARA RAO, P. G.; JYOTHIRMAYI, K.; ATYANARAYANA, A.; RAO, D. G. Effect of processing conditions on the stabilityof 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.

REN, Z.; LI, Z.; MA, M; WANG, Z.; 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, http://dx.doi.org/10.1007/s00128-008-9588-1.

REUS, A. A.; REISINGER, K.; DOWNS, T. R.; CARR, G. J.; ZELLER, A.; CORVI, R.; KRUL, C. A. M.; PFUHLER, S. Comet assay in reconstructed 3D human epidermal skin models – investigation of intra- and inter-laboratory reproducibility with coded chemicals. *Mutagenesis*, v. 28, n. 6, p. 709-720, 2013, http://dx.doi.org/10.1093/mutage/get051.

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 organismo 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.

SHARMA, S.; SHARMA, S.; PATHAK, S.; SHARMA, K. P. Toxicity of the azo dye methyl red to theorganisms in microcosms, with special reference to the Guppy (*Poecilia reticulata* Peters). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 70, p. 753-760, 2003, https://doi.org/10.1007/s00128-003-0047-8.

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.

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.; 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.

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, n. 4, p. 890-899, 2003, http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620220429.

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAQWE, R.; LANNIQ, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, v. 79, p. 1-15, 2012, http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003.

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.

STARK, H. J.; SZABOWSKI, A.; FUSENIG, N. E.; MAAS-SZABOWSKI, N. Organotypic cocultures as skin equivalents: a complex and sophisticated in vitro system. *Biological Procedures Online*, v. 6, n. 1, p. 55-60, 2004.

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.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Analytical Biochemistry, v. 27, p. 502-522, 1969, https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5.

TIMBRELL, J. A. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, v. 129, p. 1-12, 1998.

TORRES, M. A.; TESTA, C. P.; GÁSPARI, C.; MASUTTI, M. B.; PANITZ, C. M. N.; CURI-PEDROSA, R. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 923-932, 2002, https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00142-X.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; RIVERA-DEL VALLE, N.; HUANG, P. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal*, v. 10, p. 1343-1374, 2008, https://doi.org/10.1089/ars.2007.1957.

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.

TSURUWAKA, Y., KONISHI, M., SHIMADA, E. Loss of wwox expression in zebrafish embryos causes edema and alters Ca2+ dynamics. PeerJ v.3, p.1-12, 2015, http://dx.doi.org/10.7717/peerj.727.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosciences Reports*, v. 17, p. 3-8, 1997.

UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; OLIVEIRA, D. P.; TERAO, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribuition 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.; KITTAKOOP, 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.

VACCHI, F. I.; VON DER OHE, P. C.; ALBUQUERQUE, A. F.; VENDEMIATTI, J. A. S.; AZEVEDO, C. C. J.; HONÓRIO, J. G.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B.; HENRY, T. B.; NOGUEIRA, A. J.; UMBUZEIRO, G. A. Occurrence and risk assessment of an azo dye - The case of Disperse Red 1. *Chemosphere*, v. 156, p. 95-100, 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.121.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, 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.

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.

VASSAULT, A. Lactate dehydrogenase. In: Bergmyer, M.O. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis Enzymes: Oxireductases, Transferases*. Academic Press, NewYork, pp. 118-126, 1983.

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.

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.

VERMA, Y. Acute toxicity assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using Daphnia magna bioassay. Toxicology and Industrial Health, v.24, p. 491-500, 2008, 2008; http://dx.doi.org/10.1177/0748233708095769.

VERSLYCKE, T.; VERCAUTEREN, J.; DEVOS, C.; MOENS, L.; SANDRA, P.; JANSSEN, C. R. Cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following tributyltin exposure. J*ournal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 288, p. 167-179, 2003, http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00006-6.

VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mugagenesis*, v. 26, p. 11-17, 2011, https://doi.org/10.1093/mutage/geq078.

WANG, L.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, v. 269, n. 2, p. 281-290, 2008, http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.020.

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.

YU, T. H.; DAFRE, A. L.; UMBUZEIRO, G. A.; FRANCISCON, E. CYP-dependent induction of glutathione S-transferase in *Daphnia similis* exposed to a disperse azo dye. *Ecotoxicology*, v. 24, p. 232-237, 2015, http://dx.doi.org/10.1007/s10646-014-1348-x.

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 tohuman 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.; BASTC, A.; HAGEMANC, G.; OLIVEIRAA, D. P.; MARIA-ENGLERBADEPARTMENT, S. S. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic tohuman 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.

ZANONI, T. B.; TIAGO, M.; FAIÃO-FLORES, F.; BARROS, S. B. M.; BASTC, A.; HAGEMANC, G.; OLIVEIRAA, D. P. MARIA-ENGLERBADEPARTMENT, S. S. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic tohuman skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model usinghuman keratinocytes (HaCaT). *Toxicology Letters*, v. 227, p. 139-149, 2014, http://dx.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.

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, Zurique: Suíça. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim: Alemanha, v. 43, p. 5291–5292, 2003, http://dx.doi.org/10.1002/anie.200385122.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES