



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA SOROCABA**

Stephanie Helena Bortz Evaso Simas

**ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DO ÍNDIGO BLUE SINTÉTICO E NATURAL,
POR MEIO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DO ORGANISMO-
TESTE *DANIO RERIO***

Sorocaba- SP

2023

Stephanie Helena Bortz Evaso Simas

**ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DO ÍNDIGO BLUE SINTÉTICO E NATURAL,
POR MEIO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DO ORGANISMO-
TESTE *DANIO RERIO***

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado ao Instituto de Ciência e
Tecnologia de Sorocaba, Universidade
Estadual Paulista (UNESP), como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fracácio
Francisco

Sorocaba- SP

2023

S588a

Simas, Stephanie Helena Bortz Evaso

Aspectos ecotoxicológicos do índigo blue sintético e natural, por meio da análise histológica das brânquias do organismo-teste Danio rerio / Stephanie Helena Bortz Evaso Simas. -- Sorocaba, 2023

30 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba

Orientadora: Renata Fracácio Francisco

1. Toxicologia ambiental. 2. Peixe-zebra. 3. Jeans (Vestuário). I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Stephanie Helena Bortz Evaso Simas

**ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DO ÍNDIGO BLUE SINTÉTICO E NATURAL,
POR MEIO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DO ORGANISMO-
TESTE *DANIO RERIO***

Sorocaba, 22 de Junho de 2023

Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco
Orientadora

Trabalho aprovado por meio de parecer, homologado pelo Conselho de Curso em reunião de 5 de Julho de 2023.

Sorocaba- SP
2023

RESUMO

A produção anual de artigos têxteis chegou a cerca de 2,16 milhões de toneladas em 2021, implicando no lançamento crescente de efluentes provenientes da referida atividade antrópica em águas superficiais. Nesses efluentes, o corante Índigo Blue utilizado para o tingimento do jeans azul, tem se mostrado um potencial poluidor do meio aquático em função da ampla utilização na indústria têxtil, e sua larga escala de produção. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial ecotoxicológico do corante índigo blue sintético e natural, por meio da exposição de *Danio rerio* adulto em tempo crônico (21 dias), averiguando-se os aspectos qualitativos do biomarcador histológico brânquias. O trabalho também avaliou se peixes, após exposição aos corantes, e mantidos posteriormente em água de cultivo por mais 21 dias, apresentavam reversão biológica de lesões branquiais. Os resultados obtidos demonstraram toxicidade para ambos os corantes, sendo que o índigo natural desencadeou uma maior diversidade de lesão e de maior intensidade quando comparado ao índigo blue sintético e ao controle, destacando-se alterações como a fusões lamelares e a hiperplasias. Nos ensaios de recuperação biológica não foi observado reversibilidade das alterações morfológicas dos animais expostos ao Índigo sintético, ao contrário, as lesões foram progressivas mesmo 21 dias na ausência do corante, mas as lâminas do corante natural apresentaram maior número de lesões, em comparação aos animais antes de reconstituição biológica. Tais lesões sugerem uma tendência à asfixia e morte dos indivíduos, além de ser uma via de exposição do corante para demais órgãos, por tratar-se de uma região amplamente vascularizada. Diante do exposto, evidencia-se a preocupação com a vida aquática exposta a tais substâncias químicas.

Palavras-chave: ecotoxicologia; *Danio rerio*; histologia; índigo blue; índigo sintético; brânquias.

ABSTRACT

The annual production of textile articles reached approximately 2.16 million tons in 2021, resulting in an increasing release of effluents from this anthropic activity into surface waters. In these effluents, the dye Indigo Blue, used for dyeing blue jeans, has been shown to be a potential pollutant of the aquatic environment due to its widespread use in the textile industry and large-scale production. The aim of this study was to evaluate the ecotoxicological potential of synthetic and natural Indigo Blue dye through the chronic exposure of adult *Danio rerio* for 21 days, focusing on the qualitative aspects of the gill histological biomarker. The study also assessed whether fish, after exposure to the dyes and subsequently kept in culture water for an additional 21 days, exhibited biological reversal of gill lesions. The results obtained demonstrated toxicity for both dyes, with natural indigo triggering a greater diversity and intensity of lesions compared to synthetic indigo blue and the control, including alterations such as lamellar fusions and hyperplasia. In the biological recovery assays, no reversibility of the morphological changes in animals exposed to synthetic Indigo Blue was observed. On the contrary, the lesions progressed even after 21 days in the absence of the dye. However, the natural dye-treated samples showed a higher number of lesions compared to the animals before biological reconstitution. These lesions suggest a tendency towards asphyxia and death of the individuals, as well as being a route of dye exposure to other organs due to the highly vascularized nature of the gills. In light of the foregoing, concern for aquatic life exposed to such chemical substances is evident.

Keywords: ecotoxicology; *Danio rerio*; histology; indigo blue; synthetic indigo; gills.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	Poluição dos ambientes aquáticos: Ênfase para efluentes têxteis.	6
1.2	Corantes têxteis: ênfase para o Corante índigo.	7
1.3	Ensaio Ecotoxicológicos.	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivos gerais.	10
2.2	Objetivos específicos.	10
3	METODOLOGIA	11
3.1	Organismo teste <i>Danio rerio</i>.	11
3.2	Desenho experimental.	11
3.2.1	Teste de sensibilidade.	11
3.2.2	Ensaio Crônico.	12
3.2.3	Histologia.	12
3.2.4	Análise dos resultados.	13
4	RESULTADOS	16
4.1	Controle.	16
4.2	Índigo Natural.	16
4.4	Índigo Blue Sintético.	19
4.5	Índigo Blue sintético após Reconstituição biológica	20
5	DISCUSSÃO	24
6	CONCLUSÃO	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição dos ambientes aquáticos: Ênfase para efluentes têxteis

A produção anual de artigos têxteis chegou a cerca de 2,16 milhões de toneladas em 2021 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO, 2023). A fabricação de vestuários e outros itens têxteis como por exemplo roupas de cama, mesa e banho, aumenta junto com a demanda, ou seja, cresce em progressão geométrica, junto com a população mundial, implicando no lançamento crescente de volumes provenientes da referida atividade antrópica em águas superficiais.

A indústria têxtil utiliza uma grande demanda de água em seus processos, gerando uma quantidade de água residuária que geralmente contém altas cargas de sais dissolvidos, surfactantes, sólidos suspensos e matéria orgânica (SALGADO *et al.*, 2009). Os efluentes têxteis resultantes da produção, são introduzidos diretamente em corpos de águas receptores, muitas vezes sem o devido tratamento, comprometendo os múltiplos usos desses recursos, caracterizando uma fonte pontual de poluição. Apesar de ser a fonte poluidora mais fácil de se identificar, o controle desses lançamentos ainda é deficitário no Brasil (CITEVE, 2015).

Além das fontes pontuais, existem também as fontes difusas, que ocorrem em extensas áreas, no caso dos efluentes líquidos em bacias hidrográficas por exemplo, portanto não acontecem somente em um determinado local, o que torna mais difícil mensurar e identificar sua descarga, além de possuírem aportes em períodos de chuva. As fontes não-pontuais (difusas), possuem notáveis graus de contaminação, e elevados custos para sua redução e quantificação, o que faz a maioria dos países darem maior atenção à estas fontes. (BARROS, 2008).

Para evitar a deterioração dos ambientes aquáticos, bem como monitorar e restringir o lançamento de efluentes nos corpos de água receptores (incluindo-se efluentes têxteis), existem legislações que buscam controlar química e ecotoxicologicamente os corpos de água, em função dos usos desejados (Resoluções CONAMA Nº357/05 e No. 430/11). Tal controle tem como base as respostas biológicas, obtidas em ensaios ecotoxicológicos realizados com organismos-teste de

pelo menos dois níveis tróficos diferentes, que não devem apresentar toxicidade ou potencial para causar toxicidade à vida aquática

Considerando-se os efluentes têxteis e seu potencial para causar ecotoxicidade, destacam-se as moléculas sintéticas de corantes, produzidas para terem uma elevada estabilidade ambiental e consequentemente elevado poder de interação biológica. Dentre os corantes, os índigos são mundialmente utilizados em função da indústria do Jeans.

1.2 Corantes têxteis: ênfase para o Corante índigo

Corantes são substâncias químicas obtidas a partir de fontes naturais ou sintéticas que podem ser aplicados diretamente no substrato. Segundo Zanoni e Yamanaka (2016) para fornecer a cor desejada aos produtos como o couro, tecido, papel ou tintas de cabelo, são adicionados de forma solubilizada total ou parcialmente em um meio líquido (Em casos de corantes insolúveis, aditivos são adicionados, para que ocorra a solubilização), ou por quebra da estrutura cristalina, e dessas maneiras a cor será mantida no substrato através de adsorção, solvatação, ligação iônica ou covalente.

A produção mundial de corantes sintéticos chega a milhões de toneladas e justifica-se pelo menor custo de produção comparado com os corantes naturais, infinitas possibilidades de mesclas de grupos cromóforos e auxocromos que proporcionam uma maior paleta de cores, maior grau de pureza e pela fixação (PAULA, 2012). A larga escala de produção é necessária, pois corantes são empregados em diversas indústrias tais como, farmacêutica, de cosméticos, de papel, alimentícia e têxtil, e a demanda de produção é muito alta nessas áreas (OLIVEIRA, 2010).

Existem duas maneiras de se classificar corantes têxteis, a primeira através da estrutura química, que analisa o arranjo químico ou o grupo cromóforo, que seria o grupo que proporciona as cores ao corante, e a segunda pelo uso ou método de aplicação, esta classificação é feita pelo tipo de fibra onde o corante será aplicado, os tipos de fibra são naturais e não naturais (CARDOSO, 2012). Por essas especificações, o corante índigo está na classificação indigoide e à tina ou cuba (insolúveis em água).

Vários tipos de corantes indigoides são sintetizados, mas o índigo blue é o principal. O seu grupo contém elementos que recebem e doam elétrons ligados ao anel benzênico, o que atribui a cor azul forte e as propriedades redox ao corante. Corantes com essas características são aplicados em fibras como algodão, viscose e lã, e não possuem uma boa fixação, então perdem a cor durante as lavagens. Além disso, este corante tem a forma vat, pois possui caráter polimérico, que confere a baixa solubilidade em meio aquoso (ZANONI; YAMANAKA, 2016), sendo assim, no processo de tingimento se faz necessária uma reação de redução a forma leuco, com o ditionito de sódio, alterando sua cor para o amarelo, e fazendo com que o corante se solubilize em meio líquido, e após o tingimento e a exposição ao ar, ele retoma sua cor azul (BENASSI, 2021). Em função de sua ampla aplicação, justifica-se a preocupação ambiental em termos ecotoxicológicos.

1.3 Ensaios Ecotoxicológicos

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos que substâncias, naturais ou sintéticas, sobre os organismos vivos, e consequentemente a toda a cadeia alimentar, sendo ela aquática ou terrestre. Tal área do conhecimento passou a ser uma ferramenta de monitoramento ambiental, pois por meio de ensaios ecotoxicológicos, se pode evidenciar toxicidade de diversas substâncias para a fauna e a flora, desenvolver com tais dados análises de riscos e consequentemente restrições de certas concentrações ambientais para usos determinados (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Quando é feita a avaliação de toxicidade de um determinado efluente, por exemplo, somente fazer os testes químicos não é suficiente, já que este teste não poderá dizer diretamente se os organismos são afetados e também qual substância foi a causadora da toxicidade. Nesses quesitos os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas complementares aos dados químicos, pois com eles se pode avaliar a mortalidade dos organismos, os efeitos crônicos causados pelas substâncias, analisando-se uma diversidade de biomarcadores como os histológicos, bioquímicos, reprodutivos, genéticos, dentre outros, e determinar o grupo químico de maior impacto aos sistemas biológicos. (BIANCHI, 2013).

A importância desse tipo de estudo está na prevenção de impactos sobre a fauna e flora aquática, pois a contaminação é um efeito dominó, tem início apresentando efeitos não visíveis, até a alteração em um ecossistema inteiro. Se o efeito de um grupo químico ou de uma mistura for detectado em nível de célula, tecido e indivíduo, em escala laboratorial, serão preventivos e previsíveis a longo prazo, evitando-se que o dano se instale no ambiente. Os biomarcadores citológicos, bioquímicos, histológicos dos indivíduos, ou seja as respostas diante da exposição para cada indivíduo, são denominados biomarcadores, e por meio deles é possível compreender respostas adaptativas a estressores ou respostas progressivas e irreversíveis considerando-se tempo de exposição, sensibilidade da espécie, concentração e resposta biológica (ZAGATTO;BERTOLETTI, 2006).

Diante do exposto, evidencia-se a problemática do corante índigo blue em ambientes aquáticos, em função da ampla utilização na indústria têxtil, e sua larga escala de produção. A presente pesquisa pretende compreender os aspectos ecotoxicológicos dos corantes índigo blue sintético e índigo natural, por meios da exposição de adultos de *Danio rerio* aos corantes por 21 dias, bem como a capacidade de recuperação biológica, por mais 21 dias, averiguando-se os aspectos qualitativos da morfologia e semi-quantitativos das brânquias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a toxicidade crônica do corante índigo blue sintético e índigo natural por meio da exposição de peixes adultos da espécie *Danio rerio* em concentração representativa dos corantes em efluentes têxteis (100mg/L), e a capacidade de recuperação biológica por igual período de tempo, utilizando-se o biomarcador histológico de brânquias, por análise qualitativa e semi-quantitativa.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar testes ecotoxicológicos crônicos (21 dias) com adultos de *D. rerio*, na concentração de 100mg/L, averiguando os aspectos da morfologia branquial;
- Realizar ensaios de recuperação biológica, utilizando-se os peixes expostos a cada corante, que após 21 dias, foram mantidos à condição controle (ausência de contaminante) por mais 21 dias, averiguando-se os aspectos morfológicos de brânquias;
- Comparar os aspectos morfológicos de brânquias provenientes de peixes expostos aos contaminantes com o controle e com o mesmo tecido de peixes que permaneceram em ensaios de recuperação biológica para interpretar possíveis melhorias bióticas, em ambientes depurados.

3 METODOLOGIA

3.1 Organismo teste *Danio rerio*

A escolha da espécie *Danio rerio*, dá-se pelo baixo custo, fácil manutenção em laboratório, facilidade de obtenção, e facilidade na reprodução tendo as condições apropriadas, elevado número de ovos não aderentes e transparentes, além de ser uma espécie sensível e com metodologias padronizadas para testes de toxicidade no Brasil e no mundo (FRACÁCIO, 2001).

O cultivo dos organismos teste foi realizado no Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histopatologias (LATHIS) no Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, da UNESP, dentro das condições ambientais recomendadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR 15088 de 2011. A água destinada aos experimentos foi desclorada e filtrada, através de filtros especiais composto de carvão ativado e tela de silk screen com abertura de malha 25µm. Além disso, a água de cultivo foi monitorada semanalmente, para garantir que parâmetros químicos como a dureza, pH e oxigênio dissolvido, estivessem dentro dos valores ideais de seriam 44mg/L, e acima de 4mg/L, respectivamente.

A alimentação do *Danio rerio* resumiu-se na distribuição da ração tetramim ® com 97% de proteína bruta, “add libitum”, ofertada duas vezes ao dia. Os animais foram mantidos em aquários de 20L, no laboratório, na proporção de 1g de peixe por litro de água, o local dos aquários permanece à temperatura ambiente de 26°C±1°C através de um climatizador, além do foto período (12h de luz; 12h de escuro).

3.2 Desenho experimental

3.2.1 Teste de sensibilidade

Antes de começar o procedimento experimental, foi avaliada a sensibilidade do lote de peixes, utilizando o cloreto de sódio (NaCl) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011).

3.2.2 Ensaio Crônico

Partindo-se de informações literárias sobre a ecotoxicidade do corante índigo blue (FISPQ Sigma-Aldrich, 2014) e da representatividade desse corante em efluentes têxteis (Albuquerque, 2015), estabeleceu-se o valor de 100mg.L⁻¹L para dar início aos testes de toxicidade crônica com *D. rerio*. Neste ensaio foram submetidos, machos e fêmeas adultos (3 meses) de *Danio rerio*, a 21 dias em solução na referida concentração do corante, seguindo-se as recomendações de OECD (2010) adaptada para avaliação da histologia de brânquias. Foi adotado o regime semi-estático, realizando-se as trocas totais das soluções experimentais a cada 48 horas, (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2015)

Os organismos foram mantidos em aquários com capacidade para 25 litros de água. Nos experimentos, 12 aquários com 3 organismos-teste em cada, foram montados para cada corante (índigo blue sintético e índigo blue natural), separadamente e para o controle, contendo apenas água reconstituída de cultivo, obtendo-se um N=12 indivíduos para cada condição experimental e controle, a metade desses organismos foram destinados à histologia de brânquias após exposição de 21 dias e a outra metade foi introduzida nos experimentos de recuperação biológica, onde permaneceram em água reconstituída de cultivo por mais 21 dias, avaliando-se ao final, o mesmo biomarcador.

3.2.3 Histologia

Os organismos-teste após serem expostos à 21 dias dos dois tipos de corante Índigo Blue a Natural, e também os que passaram por reconstituição biológica (21 dias em água de cultivo limpa), foram sacrificados através do método de diminuição gradativa de temperatura, até chegar a 0°C, em seguida foi feita a inserção em fixador bouin, para que pudesse ser feita a análise histológica. Os animais passaram pelas etapas de desidratação em seriação gradativa de álcool e xilol e incorporação da parafina.

Os tecidos para análise em lâmina foram obtidos por cortes de 4µm, com navalha de aço, a partir de um micrótomo (micron HM340E) e corados com hematoxilina-eosina (HE). A análise destas amostras em lâmina, foram feitas em

microscópio de luz Axio Scope A1 e caracterizadas no software ZEN, priorizando a análise das brânquias.

3.2.4 Análise dos resultados

A ecotoxicologia dos corantes foi determinada por meio da comparação morfológica qualitativa do tecido das brânquias dos organismos teste expostos em cada tratamento e do controle. Comparou-se também, a histopatologia do tecido das brânquias de organismos expostos aos corantes e após os ensaios de recuperação biológica. Para a caracterização morfológica qualitativa, utilizou-se para comparação as bibliografias: Freitas (2013); Machado (1999); Mesquita (2017); Garcia-Santos *et al.* (2007); Castro *et al.* (2018); Winkaler *et al.* (2001); Cantanhêde *et al.* (2014); Santos (2018).

A análise semi-quantitativa foi realizada por meio de dois cálculos, no primeiro foi avaliando a frequência em que as lesões apareceram durante todo o experimento, com todos os ensaios juntos, e a frequência em que as lesões mapeadas no experimento ocorrem para cada ensaio. O segundo cálculo foi feito utilizando o método descrito por Vélez (2013), comparando os indivíduos expostos ao índigo Blue e natural, antes e depois da tentativa de reconstituição biológica.

O método semi-quantitativo utilizou a classificação das alterações nas brânquias do *D. rerio*, utilizando dois fatores: Estadiamento (E) e Fator de Importância (FI) em relação a saúde do peixe. O Fator de Importância é definido da seguinte forma:

- 0 = Sem alterações;
- 1 = Leve alteração: Pode ser facilmente revertida, dependendo da gravidade e da extensão da lesão;
- 2 = Alteração moderada: refletem danos nos tecidos, podem ser reversíveis ou irreversíveis;
- 3 = alteração grave: geralmente irreversível e a sua persistência e progressão pode levar a uma perda parcial ou total da função do órgão.

O tipo de lesão ou estadiamento, foi adaptado para alterações histológicas somente das brânquias, e foi dividido em I, II e III segundo a tabela 1, a seguir:

Tabela 1 - Estágio e tipos de lesão

Estágio (E)	Alterações histológicas das brânquias
I	Descolamento do epitélio lamelar
	Fusão lamelar
II	Hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar
	Proliferação celular
	Hemorragia e ruptura do epitélio lamelar
III	Aneurisma lamelar
	Desordem celular
	Vasodilatação

Fonte: Elaborada pelo autor (2023) com dados adaptados do método descrito por Vélez (2013).

Cada tipo de contaminante estudado, antes e após a reconstituição biológica, e o grupo controle, foram avaliados separadamente, e foi calculado o Estágio (E) que indica em qual fase estavam as lesões dos grupos determinados na tabela 1, exemplo no grupo I o Estadiamento irá apresentar se o descolamento do epitélio lamelar ocorre para os tipos de corante, e em qual grau ele está, se foi leve, moderado ou grave. Também foram medidos o Índice patológico total do peixe (Tp) e Índice patológico total do grupo experimental (Tg), que foram comparados com o valor encontrado para o controle, que seria o Índice patológico ideal, assim os índices que tiveram valores mais distantes do grupo controle, são os que são mais tóxicos aos organismos teste. Os grupos experimentais avaliados foram: Controle, Índigo Blue antes e pós reconstituição biológica e Índigo Natural antes e pós reconstituição biológica. As equações utilizadas e a descrição dos elementos estão apresentadas, a seguir:

$$Ea = \sum (Y \times FI) \quad (1)$$

$$Tp = EI + EII + EIII \quad (2)$$

$$Tg = \sum TP / n \quad (3)$$

Onde:

E: Estágio

a: estágio I, II ou III

Y: ausência de alteração (0) ou presença (1)

FI: fator de importância

n: número total de indivíduos analisados por grupo

Tp: índice patológico total do peixe

TG : índice patológico total do grupo experimental.

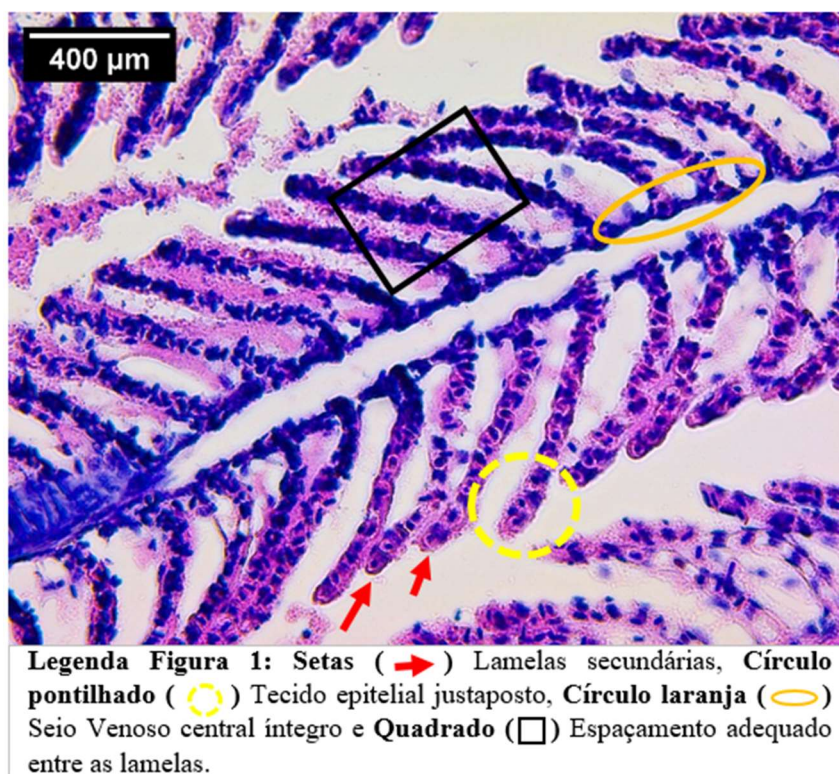
4 RESULTADOS

Com os resultados obtidos, foi possível avaliar a toxicidade do corante Índigo Blue natural e sintético, antes e após a reconstituição biológica.

4.1 Controle

As brânquias de um dos animais que fez parte do controle, estão nas Figuras 1 onde se pode observar lamelas secundárias bem desenvolvidas, com tecido epitelial simples pavimentoso justaposto que estão dentro dos padrões encontrados na literatura, como mostra o trabalho de Freitas (2013), onde as lamelas são os filamentos contínuos, sem “inchaços” e sem proliferação de células, e os espaços interlamelares são adequados para as trocas gasosas.

Figura 1 - Brânquia de peixe exposto ao controle



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

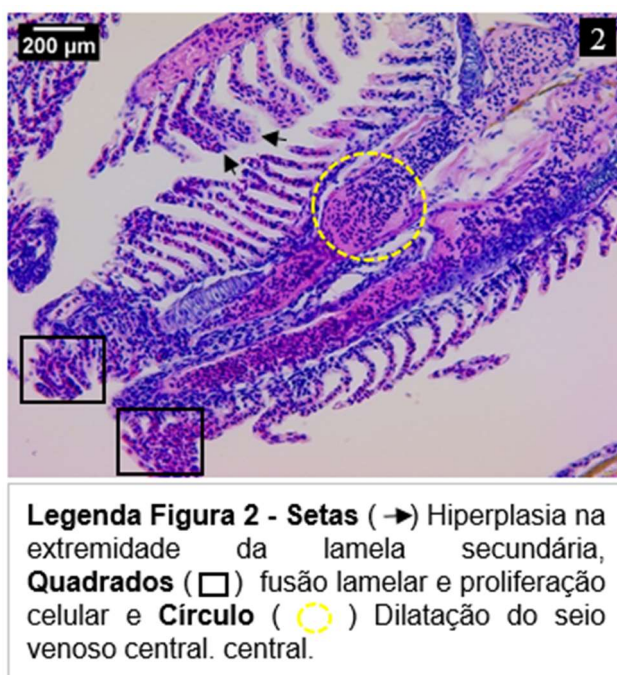
4.2 Índigo Natural

Pode-se observar claramente os efeitos nocivos do corante natural às brânquias dos peixes nas figuras 2 e 3, que mostram esses efeitos em dois peixes expostos ao Índigo natural.

Na Figura 2, as **setas** indicam hiperplasia nas extremidades das lamelas secundárias (aumento do tecido por grande número de células), mas sem alterar o tamanho das células (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007), neste mesmo peixe encontramos fusão lamelar, então duas ou mais lamelas branquiais se uniram, e também podemos ver proliferação celular (**Quadrados**). Já no **Círculo**, podemos ver dilatação do seio venoso central. Tais alterações foram observadas em todos os organismos expostos à referida condição experimental.

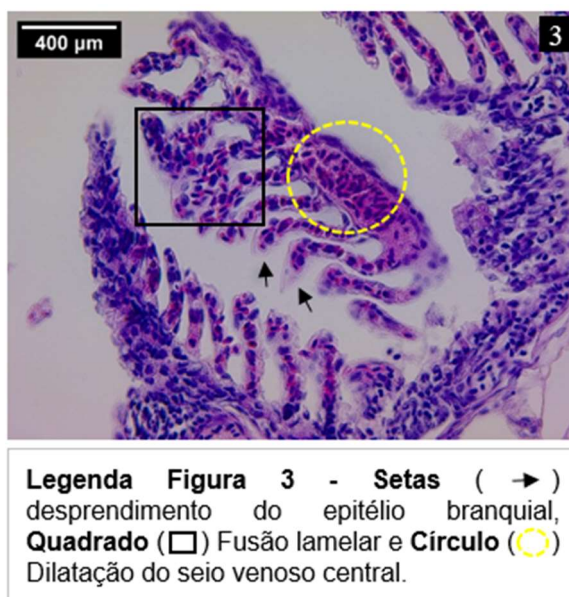
Seguindo na Figura 3, podemos ver alteração em outro organismo-teste do experimento, novamente se pode identificar fusão de lamelas secundárias (**Quadrado**) e dilatação do seio venoso central (**Círculo**), e por fim as **setas** indicam desprendimento do epitélio branquial (CASTRO *et al.*, 2018).

Figura 2 - Lâmina Índigo Blue Natural peixe 2



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 3 - Lâmina Índigo Blue Natural peixe 3

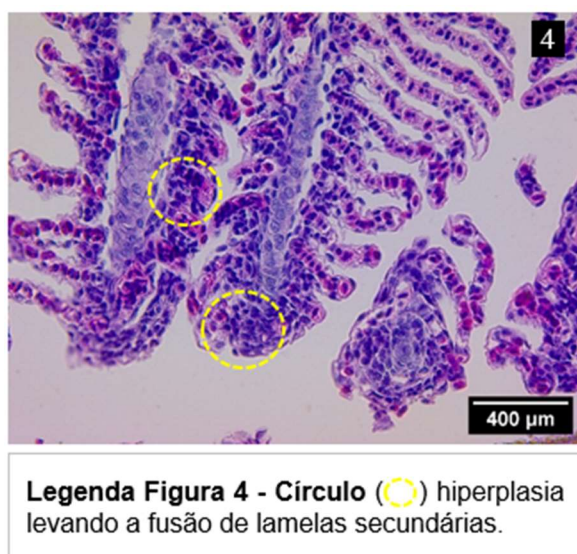


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.3 Índigo Natural após reconstituição biológica

Na Figura 4 e 5 estão dois peixes que foram expostos ao Índigo natural e em seguida passaram por reconstituição biológica. Em 4, foi identificado com o **círculo** hiperplasia levando a fusão de lamelas secundárias (WINKALER *et al.*, 2001). Já em 5, houve novamente dilatação do seio venoso central (**Quadrado**), e também hiperplasia levando a fusão de lamelas secundárias indicado com um **círculo** (CANTANHÊDE *et al.*, 2014).

Figura 4 - Lâmina Índigo Natural após Reconstituição biológica peixe 4



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 5 - Lâmina Índigo Natural após Reconstituição biológica peixe 5



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

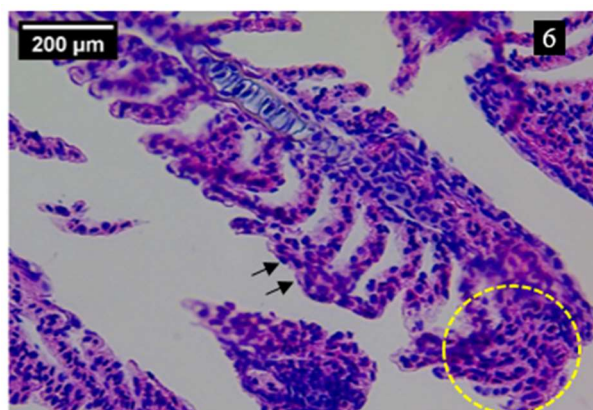
4.4 Índigo Blue Sintético

As Lâminas das brânquias de outros dois animais, porém agora expostos ao índigo blue sintético, estão na figura 6 e 7, podemos ver com clareza os prejuízos trazidos pela toxicidade do corante.

Na Figura 6, está indicado com **setas** hiperplasia nas extremidades das lamelas secundárias, e exposto com o **círculo** a fusão lamelar que é consequência da hiperplasia das células epiteliais das lamelas e dos filamentos branquiais. O estágio da fusão vai depender da intensidade e localização da hiperplasia. Na área indicada pelas **setas**, houve hiperplasia parcial, já que ocorreu somente em uma parte da lamela, na extremidade, já na área do **círculo**, ocorreu hiperplasia total (CANTANHÊDE *et al.*, 2014).

Em outro peixe exposto ao Índigo Blue sintético que está na Figura 7, pode-se observar a mesma lesão, fusão lamelar, porém com desordem (**Retângulo**), e somente fusão lamelar indicado no **círculo**, mas também exposto pelas **setas** hiperplasia na extremidade das lamelas secundárias, sendo assim pode-se dizer que esse tipo de lesão é recorrente para peixes expostos a esse corante.

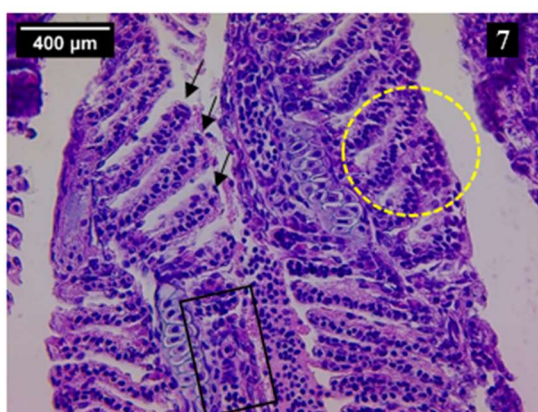
Figura 6 - Lâmina Índigo Blue Sintético peixe 6



Legenda Figura 6 - Setas (→) Hiperplasia na extremidade da lamela secundária e **Círculo** (○) fusão das lamelas secundárias.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 7 - Lâmina Índigo Blue Sintético peixe 7



Legenda Figura 7 - Setas (→) Hiperplasia na extremidade das lamelas, **Retângulo** (□) Fusão lamelar com desordem e **Círculo** (○) Fusão das lamelas secundárias.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.5 Índigo Blue sintético após Reconstituição biológica

Após a exposição ao corante sintético, alguns animais passaram por reconstituição biológica, o resultado está nas Figuras 8 e 9.

No **círculo** da Figura 8, as lamelas estão totalmente fundidas, já no **quadrado** ocorreu vasodilatação das lamelas branquiais (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007). Na segunda imagem (9), dentro do **círculo** observa-se o rompimento do epitélio branquial

por hiperplasia, e também houve fusão das lamelas (**Quadrado**) por hiperplasia (SANTOS, 2018).

Figura 8 - Lâmina Índigo Blue Sintético após Reconstituição Biológica Peixe 8



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 9 - Lâmina Índigo Blue Sintético após Reconstituição Biológica Peixe 9



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Sendo assim, comparando as Figuras de 2 a 9, com a 1 (Controle), podemos notar a visível diferença entre as brânquias do controle e as expostas aos corantes.

Na Tabela 2, temos o compilado e frequência de todas as lesões separado por exposição, como descrito na metodologia, a Frequência de lesões por ensaio, mede quantas das lesões mapeadas neste estudo aparecem em cada exposição, já a Frequência de cada lesão no experimento mede em quantas das exposições cada lesão aparece.

Tabela 2 - Compilado de lesões obtidas a partir da exposição de peixes aos corantes Índigo Blue sintético e natural e após as condições de reconstituição biológica

Lesões/ Exposição	Índigo Natural	Reconstituição biológica pós Índigo Natural	Índigo Blue	Reconstituição biológica pós Índigo Blue sintético	Frequência de cada lesão no experimento todo
Fusão Lamelar	x	x	x	x	100%
Rompimento do eptélio				x	25%
Hiperplasia	x	x	x	x	100%
Dilatação do seio venoso central	x	x			50%
Desprendimento de eptélio	x				25%
Vasodilatação				x	25%
Desordem			x		25%
Frequência de lesões por ensaio	57%	43%	43%	57%	

Fonte: Autoria própria (2023).

Na Tabela 3, temos o resultado dos cálculos dos Índices patológicos para cada um dos ensaios, utilizando o método de Vélez (2013), descrito na metodologia. Sabendo que foram analisados 2 organismos de cada ensaio para obtenção dos resultados.

Tabela 3 - Índice patológico obtido por meio da análise das lesões encontradas em todo o experimento

$Ea = \sum (Y \times FI)$				$Tp = EI + EII + EIII$	$Tg = \sum TP / n$
Ensaio	Estágio I (EI)	Estágio II (EII)	Estágio III (EIII)	Índice patológico total dos 2 peixes (Tp)	Índice patológico total do grupo experimental (Tg)
Controle	0	0	0	0	0
Índigo Natural	2	2	0	4	2
Pós Rec bio	1	1	0	2	1
Índigo Blue	3	1	2	6	3
Pós Rec bio	3	6	2	11	5,5

Fonte: Autoria própria (2023).

Onde:

E: Estágio

a: estágio I, II ou III

Y: ausência de alteração (0) ou presença (1)

FI: fator de importância

n: número total de indivíduos analisados por grupo

Tp: índice patológico total do peixe

TG : índice patológico total do grupo experimental.

5 DISCUSSÃO

As brânquias são excelentes órgãos para serem avaliados em ensaios ecotoxicológicos, já que são a porta de entrada para xenobióticos presentes no ambiente aquático. Este órgão realiza as trocas gasosas entre o animal e a água, levando os possíveis estressores para todos os órgãos do corpo através do sangue. Sendo assim, se existe algum poluente na água, não só a respiração do peixe será prejudicada, mas todas as demais funções vitais (VIANA, 2020).

O que pode ocorrer diretamente nas brânquias após o contato com poluentes, seriam as toxinas penetrarem nas lamelas branquiais e competirem com os sais que são absorvidos para o controle da osmorregulação, obstruindo as vias das células, evitando as trocas gasosas e a osmorregulação (FREITAS, 2013).

Como exposto nos resultados, o grupo controle teve bons resultados comparado com a literatura, então o lote de peixes utilizado para o experimento estava em boas condições e iguais aos animais saudáveis presentes na natureza, validando mais ainda o experimento.

Agentes irritantes dissolvidos ou suspensos na água, podem entrar por exposição oral ou durante as trocas gasosas, no processo respiratório. O agente estressor pode deixar vestígios pelos caminhos por onde este percorreu dentro do corpo do organismo, impedindo que agentes sólidos essenciais para a vitalidade dos peixes percorram os filamentos branquiais, causando-lhe danos. Sendo assim, é quase inevitável que com altas concentrações de sólidos na água, a morfologia das brânquias não seja alterada (MACHADO, 1999).

Lesões como desprendimento do epitélio, hiperplasia (parcial ou total) e fusão lamelar como houveram nos peixes expostos aos dois corantes e se mantiveram após a reconstituição biológica, são defesas das brânquias dos peixes quanto são expostas a poluentes, e estes tipos de lesões dificultam as trocas gasosas do animal e sua sobrevivência. (CASTRO *et al.*, 2018).

Mesmo com a tentativa de reconstituição biológica, os resultados não se mostraram reversíveis, ainda foi possível observar que as brânquias ficaram com aspectos morfológicos ainda com alterações no caso do corante natural, porém com menor frequência, já no Índigo sintético, apesar da expectativa de melhora do animal, houve uma progressiva lesão nos tecidos branquiais, gerando até dificuldade de identificação do órgão nos cortes analisados ao microscópio óptico.

Visto que as brânquias são uma ampla área superficial para o fluxo de diversos compostos entre o sangue do peixe e a água, mesmo após tirarmos o contato entre o peixe e o corante Índigo natural, os efeitos continuam sendo nocivos ao animal, já que a desordem das células ficou bem mais clara após a reconstituição biológica (WINKALER *et al.*, 2001). As condições progrediram negativamente provavelmente pelo longo prazo de exposição do animal ao poluente (CANTANHÊDE *et al.*, 2014).

Na Tabela 2 dos resultados, temos o compilado de todas as lesões, podemos ver que o corante Índigo Natural causa mais danos às brânquias a curto prazo, e estes diminuem após a reconstituição biológica. Para o Índigo Blue sintético, a curto prazo não causa tantos danos quanto o Natural, mas após a reconstituição biológica, o número de lesões cresce muito. Além disso, as lesões fusão lamelar e hiperplasia ocorreu em 100% dos ensaios, enquanto vaso dilatação, levantamento e rompimento de epitélio e desordem somente em 25%. Porém apesar das frequências de lesões serem mais intensas no corante Índigo Blue sintético, todas as situações indicaram toxicidade.

Os resultados dos índices patológicos, dispostos na Tabela 3 dos resultados, atestam os valores de frequência, já que temos um índice maior para o Índigo Natural e baixo após a reconstituição biológica, e para o Índigo sintético o índice é grande, mas aumenta após a recuperação biológica, todos em relação ao controle, que seria o Índice ideal igual a zero.

Apesar da não efetividade da reconstituição biológica no tempo de 21 dias estudado na presente pesquisa, outros tempos, após tratamentos dos corantes, devem ser investigados.

Na literatura, ainda existem alguns dados que consideravam no passado, como a de Silva (2007), que em raras exceções e em altos níveis de exposição o corante pode ser tóxico aos peixes, mas neste experimento, com 100mg/L é possível ver lesões de grandes proporções para o tecido em estudo, e principalmente, nenhuma recuperação após retirarmos o organismo do contato com o corante por 21 dias.

6 CONCLUSÃO

Tanto o índigo blue sintético como o natural mostram-se tóxicos por meio da avaliação qualitativa e semi-quantitativa de brânquias, após exposição de 21 dias a 100 mg.L⁻¹ de cada corante;

No tempo de 21 dias para o estudo de recuperação biológica, não foram observadas reversibilidade das lesões branquiais, considerando-se os peixes provenientes da exposição de cada tipo de corante, demonstrando a toxicidade dos corantes estudados e a intensidade da atuação ecotoxicológica, com base na espécie de peixe estudada.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO. **Perfil do Setor:** dados gerais do setor referentes a 2021 (atualizados em janeiro de 2023). 2023. Disponível em: < <https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 25 abr. 2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. 2. ed. Rio de Janeiro, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15499:** Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes. 2. ed. Rio de Janeiro, 2015.

ALBUQUERQUE L. F. **Aplicação de água residuária das salinas no tratamento de efluente têxtil.** 2009. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

BARROS, A. M. L. **Modelagem da poluição pontual e difusa:** aplicação do modelo Moneris à bacia hidrográfica do rio Ipojuca. 2008. Dissertação (Mestrado engenharia civil na área de Tecnologia Ambiental e Recursos hídricos) – Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2008. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/4919>>. Acesso em: 14 mai. 2021.

BENASSI, J. C. **Estudo de remoção de cor de um efluente têxtil sintético contendo corante índigo blue tratado por processos oxidativos avançados utilizando Fenton (H₂O₂/Fe²⁺), foto-Fenton (H₂O₂/Fe²⁺/UV) e oxidação fotoquímica (UV/H₂O₂).** 2021. Dissertação (Mestrado em ciências, ênfase em têxtil e moda) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Disponível em: < https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/100/100133/tde-05112021-110647/publico/Dissertacao_Final_Jean_Benassi.pdf >. Acesso em: 25 abr. 2023.

BEZERRA, A. G. **Biorremediação de azul de indigotina por lacase imobilizada em goma e em polissacarídeos purificados de Anadenanthera colubrina.** 2019. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019. Disponível em < <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/10711/2/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20-%20Alyne%20Gon%c3%a7alves%20Bezerra%20-%202019.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2023.

BIANCHI, M. O. **Ensaio ecotoxicológicos como ferramenta para avaliação do impacto ambiental de resíduos de mineração sobre o solo.** 2013. Tese (Doutorado em Ciências, em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013. Disponível em:<<https://tede.ufrrj.br/jspui/bitstream/jspui/2004/4/2013%20-%20Miriam%20de%20Oliveira%20Bianchi.pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2021.

BRASIL. CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005.
Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, 2005.

CANTANHÊDE, S. M. *et al.* Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís – MA. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.2, p.593-601, 2014. Disponível em: <
<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/hmCkZp9MDnmmdqM8H46F78n/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em 20 nov. 2022.

CARDOSO, N. F. **Adsorção de corantes têxteis utilizando biossorventes alternativos.** 2012. 120 f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível, em:<
<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/63143/000869354.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 25abr. 2023.

CASTRO, J. S. *et al.* Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no Complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.70, n.2, p.410-418, 2018. Disponível em: <
<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/WkHSntvJ8Th8TsDWrzpkS8q/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

CENTRO TECNOLÓGICO TÊXTIL E VESTUÁRIO. **Estudo das dificuldades das empresas do setor têxtil e vestuário no cumprimento da legislação ambiental.** [S. l.], 2012. Disponível em: <
https://www.citeve.pt/filedownload.aspx?schema=4c65f7f1-2e56-4968-a1af-585420fa64e0&channel=33A8429E-32D2-4D7E-8B1D-2527EA09A53F&content_id=3B40080B-E82E-4658-B55A-FF035D3BA2C8&field=storage_image&lang=pt&ver=1&filetype=pdf&dtestate=2012-09-13110505>. Acesso em: 14 mai. 2021.

FRACÁCIO, R. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos (Cypriniformes, Cyprinidae) e análise limnológica para avaliação ambiental dos reservatórios do Médio e Baixo Tiête(SP).** 2001. 233 f. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais) - Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-25012017-155146/en.php>>. Acesso em: 26 abr. 2023.

FREITAS, R. A. *et al.* **Avaliação** das brânquias de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de gasolina e diesel. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 23, p. 59-66, jan./dez. 2013. Disponível em:
<<https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/14410/5/Artigo%20-%20Rafael%20Alves%20de%20Freitas%20-%202013.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

GARCIA-SANTOS, S. *et al.* Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.2, p.376-381, 2007. Disponível em: <
<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/qgyvKXtKdGJ34Kjx3zG85gG/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Ciênc. Biol. Saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, out. 1999. Disponível em: <<https://journalhealthscience.pgsskroton.com.br/article/download/1782/1694#:~:text=Nesse%20contexto%20adaptativo%2C%20as%20br%C3%A2nquias,de%20compostos%20nitrogenados%20e%20gusta%C3%A7%C3%A3o.>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis - Monitoramento biológico em ecossistemas aquáticos continentais**, vol.12, n.3, pág.355-381, 2008. Disponível em:<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/27395/2/danielemagalhaes_aloyioferrao_IOC_2008.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2021.

MESQUITA, C. M. S. **Controle de qualidade na indústria têxtil**. 2017. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2017. Disponível em:<https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/35246/1/2017_tcc_cmsmesquita.pdf>. Acesso em 15 jan. 2023.

JOHSON, R.; WOLF, J.; BRAUNBECK, T. **Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads**. Paris, 2010. Disponível em:<<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/42140701.pdf>>. Acesso em: 11 jun 2023.

OLIVEIRA, M. C. L. **Descloração de corante industrial têxtil por *Pseudomonas oleovorans* CBMAI 0703**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010. Disponível em:<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1303/1/arquivo118_1.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2023.

PAULA, E. S. **Avaliação da mutagenicidade dos corantes Sudan III, Vat Green 3, Reactive Orange 16 e Reactive Black 5 por meio do ensaio de micronúcleos em células HepG2**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em ciências ênfase em toxicologia) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-21052012-111937/publico/Dissertacao_Eloisa_corrigida.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2023.

SANTOS, D. S. **Alterações histopatológica em brânquias de peixes e anfíbios causadas pelo uso do formaldeído**. 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado em aquicultura e pesca) – Instituto da Pesca, São Paulo, 2018. Disponível em:<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=6648560>. Acesso em 20 nov. 2022.

SALGADO, B. C. B.; NOGUEIRA, M. I. C.; RODRIGUES, K. A.; SAMPAIO, G. M. M. S.; BUARQUE, H. L. B.; ARAÚJO, R.S. Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV/H₂O₂). **Eng Sanit Ambient**, v.14, n.1, jan/mar 2009. Disponível em

<<https://www.scielo.br/j/esa/a/6RN8xzPHB5kMtwGX5rN9rdq/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 25 abr 2023.

SIGMA ALDRICH. **Safety Data Sheet** - Índigo Blue. [S.l.], 2014. Disponível em:<<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=229296&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F229296%3Flang%3Dpt>>. Acesso em: 25 abr. 2023.

SILVA, K. K. O. S. **Caracterização o efluente líquido no processo de beneficiamento do Índigo Têxtil**. 2007. 177 f. Dissertação (Mestrado em engenharia mecânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007. Disponível em:<<https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/15532/1/KesiaKOSS.pdf>>. Acesso em 15 Jan 2023.

VÉLEZ, P. R. C. **Uso de biomarcadores de genotoxicidade e histopatológicos para avaliação de toxicidade de vermiculita expandida magnética e vermiculita expandida em peixes *Danio rerio***. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em biologia animal) – Universidade de Brasília. Brasília, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13626/1/2013_PaolinRocioCaceresVelez.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2023

VIANA, N. P. **Avaliação dos efeitos da exposição aguda aos agrotóxicos 2,4-D e Fipronil em brânquias de *Danio rerio***. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/13439/RI.pdf?sequence=5>>. Acesso em 02 de Nov 2022.

WINKALER, E. U. *et al.* Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001. Disponível em: <<https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/2708/2027>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 478 p.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. (org.). **Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. São Paulo: Cultura acadêmica, 2016. 344 p.