



JANETE DA SILVA

**ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICAS DO AZOCORANTE ALIMENTAR AMARELO
TARTRAZINA EM ENSAIOS DE MULTIGERAÇÕES DE *Danio rerio* (PISCIS,
CYPRINIDAE) E *Daphnia similis* (CRUSTACEA, CLADOCERA).**

Sorocaba

2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em
Ciências Ambientais

JANETE DA SILVA

**ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICAS DO AZOCORANTE ALIMENTAR AMARELO
TARTRAZINA EM ENSAIOS DE MULTIGERAÇÕES DE *Danio rerio* (PISCIS,
CYPRINIDAE) E *Daphnia similis* (CRUSTACEA, CLADOCERA).**

Tese de doutorado apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Renata Fracácio Francisco

Sorocaba

2020

- S586a Silva, Janete da
Análises ecotoxicológicas do azocorante alimentar amarelo tartrazina em ensaios de multigerações de *Danio rerio* (piscis, Cyprinidae) e *Daphnia similis* (crustacea, Cladocera). / Janete da Silva. -- Sorocaba, 2020
192 p.: il., tabs., fotos.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba
1. Ecotoxicologia. 2. Histologia. 3. *Danio rerio*. 4. *Daphnia similis*.
5. Corantes. I. Título.

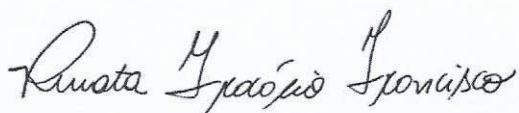
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Análises ecotoxicológicas do azocorante alimentar amarelo tartrazina em ensaios de multigerações de *Danio rerio* (pyscis, Cyprinidae) e *Daphnia similis* (crustácea, Cladocera)

AUTORA: JANETE DA SILVA

ORIENTADORA: RENATA FRACÁCIO FRANCISCO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:



Profª. Drª. RENATA FRACÁCIO FRANCISCO
Engenharia Ambiental / Unesp - ICT Sorocaba

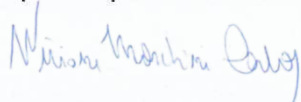


Profª. Drª. MARIA DA GRAÇA GAMA MELÃO
Departamento de Hidrobiologia / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Câmpus São Carlos



Prof. Dr. EDUARDO BERTOLETTI
Consultor em Ecotoxicologia Independente

Profª. Drª. SUZELEI RODGHER
Unesp - Câmpus de São José do Rio Preto



Profª. Drª. VIVIANE MOSCHINI CARLOS
Departamento de Engenharia Ambiental / Unesp - Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba

Sorocaba, 01 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco, pelo apoio, confiança e orientação. Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, representado pelo Prof. Dr. José Arnaldo Frutuoso. Ao Prof. Dr. Paulo Tonello, pelo apoio e empréstimo dos laboratórios. A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, especialmente à UNESP Campus Sorocaba por todo o espaço e infraestrutura cedidos. Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais por todo o conhecimento adquirido. As técnicas do laboratório de solos, química e biologia da Unesp Sorocaba Susan Lessa, Letícia Gonçalves e Sandra Gavetti. A Lilian Helena Mathilde, Carlos Henrique Reche e Eva de Sousa Rodrigues que sempre me orientaram com as burocracias da pós-graduação. As professoras Evelise Nunes Fragoso de Moura e Maria da Graça Gama Melão Graça, da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar pelas valiosas orientações na qualificação.

A minha primeira professora de Biologia, Profa. Ruth Ayres de Araújo, grande responsável pela escolha da minha profissão.

*Aos amigos da pós-graduação; Claudia Watanabe, pela doação das algas *Raphidocelis subcapitata*, utilizadas como alimento das *Daphnia. similis*; a doutoranda Karen, por ter cedido as *D. similis*. Aos companheiros do Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia (LATHIS), Vivian Lira, pelo apoio e amizade; Sofia Coelho, pela ajuda inestimável com os peixes e incentivos nas reproduções; aos alunos de iniciação científica, principalmente a Bianca Aureliano, pela indispensável ajuda nos ensaios crônicos, reproduções dos peixes, processamento e cortes histológicos; a Samara, pelos dados dos ensaios agudos decorante com os *Danio rerio*. A Stefani, Pablo, Natassya, Priscila, Jenifer, Carol, pela ajuda na alimentação e manutenção dos *D. rerio*.*

Ao pessoal da portaria pela paciência de me suportar alta horas nos laboratórios e fins de semana intermináveis!! À todos os funcionários, ao pessoal da Biblioteca, pela colaboração.

A minha família e amigos, Muito Obrigada!

*Especialmente,
Aos *Danio rerio*!*

“Não importa o que aconteça, continue a nadar”.

Walters Graham,
Procurando Nemo (2003)

RESUMO

Nas últimas décadas, comidas industrializadas de enorme variedade, fácil aquisição e preparo rápido vêm perpetuando-se no cotidiano dos indivíduos. Grande porcentagem dos alimentos industrializados contém conservantes, antioxidantes e aditivos, como os corantes artificiais. Atualmente, poucos estudos sobre o consumo de aditivos e efeitos à saúde coletiva foram realizados, e entre esses aditivos, o azocorante amarelo tartrazina é o mais requisitado pelas indústrias e empresas do ramo de alimentos. O grupo é um derivado nitroso que transmite confiabilidade, devido a sua durabilidade, cores vistosas, fácil aplicação e homogeneidade na coloração nos alimentos; porém, muitos estudos o apontam como causador de reações adversas à saúde humana, como desencadeantes de alergias, alterações no comportamento, carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade a longo prazo. Sabe-se que muito do corante é perdido nos processos de fabricação industrial e comercial, e este, se lançado sem tratamento nos corpos hídricos, podem comprometer a biota aquática. Analisando essa problemática, essa pesquisa trabalhou com dois padrões do corante: industrial (padrão puro 100% - PA) e comercial (padrão 86% - PC) em quantidades mínimas (50 mg.L^{-1}) e máximas (500 mg.L^{-1}) estipuladas para alimentos pelos órgãos de legislações internacionais alimentares. Foram realizados ensaios de multigerações com o microcrustáceo *Daphnia similis* e o peixe *Danio rerio*, analisando-se desempenhos reprodutivos, condições de sobrevivência e a capacidade de recuperação biológica dos organismos, após ensaios ecotoxicológicos. Em *D. rerio*, após ensaio crônico de vinte e um dias, reproduções foram realizadas e seus ovos, embriões e larvas foram monitorados até a idade adulta, sob a influência dos corantes. Esses peixes (geração F1) permaneceram nos corantes e aos onze meses foram colocados para reproduções. Na geração F2, ovos, embriões e larvas foram analisados sob microscópio e as alterações fotografadas. Os peixes da geração F0, após as reproduções, foram sacrificados e seus tecidos levados à corte histológico para análise de suas gônadas femininas e masculinas. Os resultados apresentaram efeito crônico na população de *D. similis*, porém com ligeira recuperação biológica após retirada dos organismos dos corantes. Em *D. rerio* a viabilidade dos ovos sofreu quedas drásticas nas duas gerações; embriões e larvas da geração F2 apresentaram diversas deformidades morfológicas e as análises quali-quantitativas das gônadas femininas e masculinas apresentaram alterações significativas em seu desenvolvimento, corroborando com às observações dos aspectos impactantes analisados no desenvolvimento dos embriões e larvas da espécie. O corante alimentar amarelo tartrazina, se lançado diretamente em corpos aquáticos, sem o devido tratamento nos efluentes que o contém, causará elevada ecotoxicidade à biota desses ecossistemas. Seu uso como aditivo alimentar deve ser reavaliado.

Palavras-chave: Reproduções, Recuperação biológica, Legislação de alimentos, Bioindicadores, Histopatologia.

ABSTRACT

In the last decades, industrialized foods of enormous variety, easy to acquire and quick preparation have been perpetuating in the daily lives of individuals. A large percentage of processed foods contain preservatives, antioxidants, and additives, such as artificial colors. Currently, few studies on the consumption of additives and effects on collective health have been carried out, and among these additives, the yellow tartrazine azo dye is the most requested by food industries and companies. The group is a nitrous derivative that conveys reliability, due to its durability, showy colors, easy application, and homogeneous coloring in food; however, many studies have pointed out that it causes adverse reactions to human health, as triggers of allergies, changes in behavior, carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity in the long term. It is known that much of the dye is lost in industrial and commercial manufacturing processes, and this, if released without treatment in water bodies, can compromise aquatic biota. Analyzing this problem, this research worked with two dye patterns: industrial (100% pure standard - PA) and commercial (86% standard - PC) in minimum (50 mg.L⁻¹) and maximum (500 mg. L⁻¹) stipulated for food by the bodies of international food law. Multigeneration tests were performed with the microcrustacean *Daphnia similis* and the fish *Danio rerio*, analyzing reproductive performance, survival conditions, and the biological recovery capacity of the organisms, after ecotoxicological tests. In *D. rerio*, after a chronic test of twenty-one days, reproductions were performed and their eggs, embryos, and larvae were monitored until adulthood, under the influence of dyes. These fish (F1 generation) remained in the dyes and at eleven months were placed for breeding. In the F2 generation, eggs, embryos, and larvae were analyzed under a microscope and the changes were photographed. The fish of the F0 generation, after reproduction, were sacrificed and their tissues were taken to the histological court for analysis of their female and male gonads. The results had a chronic effect on the population of *D. similis*, but with slight biological recovery after removal of the dye organisms. In *D. rerio* the viability of the eggs suffered drastic falls in both generations; embryos and larvae of the F2 generation showed several morphological deformities and the qualitative and quantitative analyzes of the female and male gonads showed significant changes in their development, corroborating the observations of the impacting aspects analyzed in the development of the embryos and larvae of the species. Tartrazine yellow food coloring, if released directly into aquatic bodies, without proper treatment in the effluents that contain it, will cause high ecotoxicity to the biota of these ecosystems. Its use as a food additive should be reassessed.

Keywords: Reproductions, Biological recovery, Food legislation, Bioindicators, Histopathology.

Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
Corantes azo	16
1. Artigo.....	20
1.1. Introdução.....	21
1.2. Methodology.....	23
1.3. Composition and chemical structure of the tartrazine yellow dye	23
1.4. Regulations on the use of tartrazine yellow dye.....	25
1.5. Tartrazine toxicity	27
1.6. Evaluation of tartrazine ecotoxicity.....	29
1.7. Results.....	29
1.8. Ecotoxicological analyses.....	29
1.9. Discussion	40
1.10. Conclusions	41
Referências	42

Capítulo 2: Ecotoxicidade do corante alimentar amarelo tartrazina nos organismos teste.52

Resumo	52
2.1. Introdução	53
2.2. Desenho experimental	56
2.3. Análise química do corante tartrazina	58
2.4. Análises estatísticas.....	59
2.5. Resultados	59
2.6. Testes de ecotoxicidade <i>D. similis</i>.....	60
2.7. Reprodução de testes de ecotoxicidade da espécie <i>D. rerio</i>	64
2.8. Análises químicas	65
2.9. Discussão	71
2.10. Conclusões	74
Referências	75

Capítulo 3: Ecotoxicidade do corante amarelo tartrazina em embriões de *Danio rerio*.....80

3.1. Introdução	81
3.2. Desenho experimental	83
3.3. Análise química do corante tartrazina	86
3.4. Análises estatísticas.....	86

	11
3.5. Resultados	87
3.5.2. Reprodução de testes de toxicidade crônica de <i>D. rerio</i>	90
3.5.2.2. Geração F1	91
3.5.2.2.1. Reproduções geração F1	92
3.5.3. Observações morfológicas de ovos de <i>D. rerio</i> de 3 hpf e 24 hpf.....	93
3.5.4. Análises químicas.....	95
3.6. Discussão	96
3.7. Conclusões	98
Referências	99
Capítulo 4: Ecotoxicidade do corante amarelo tartrazina em larvas de <i>Danio rerio</i> após exposição multigeracional.....	102
4.1. Introdução	103
4.2. Desenho experimental	105
4.3. Análise química do corante tartrazina	108
4.4. Análises estatísticas.....	108
4.5. Resultados	109
4.5.2. Reproduções dos testes de toxicidade de <i>D. rerio</i>	111
4.5.2.1. Geração F0.....	110
4.5.2.2. Desenvolvimento da geração F1 exposta ao corante	112
4.5.2.3. Deformidades morfológicas em larvas da geração F2 (48, 72 e 96 hpf)	113

	12
4.6. Caracterização química do corante	123
4.7. Discussão	124
4.8. Conclusões	127
Referências	129
Capítulo 5. Histopatologia quali-quantitativa de gônadas femininas e masculinas em <i>Danio rerio</i> submetidos à ensaios crônicos com o azocorante alimentar amarelo tartrazina.	134
5.1. Introdução	135
5.1.1. Biomarcadores histológicos	136
5.2. Materiais e Métodos	138
5.2.1.1. Tratamento histológico das gônadas.....	139
5.2.1.1.1. Método de análise quali-quantitativo	141
5.3. Análise da degradação do corante amarelo tartrazina.....	141
5.4. Análises estatísticas.....	142
5.5. Análise qualitativa das gônadas de <i>D. rerio</i>	143
5.5.1.1. Estrutura dos ovários maduros	144
5.5.2. Gônada masculina	145
5.5.2.1. Estrutura do testículo maduro	146
5.6. Resultados	149
5.6.4. Análises Qualitativas das Gônadas Femininas	154
5.6.4.1. Gônadas femininas – Controle	155

5.6.4.2. Gônadas femininas - 50 PC	156
5.6.4.3. Gônadas femininas 50 PA	158
5.6.4.4. Gônadas femininas 500 PA	159
5.6.5. Análises Quali - Quantitativas das Alterações nas Gônadas Femininas	161
5.6.5.1. Presença/Ausência das fases de desenvolvimento ovocitário	161
5.6.5.1.1. Gônadas femininas – Alterações significativas	162
5.6.5.2. Fator de Impacto (FI)	165
Fator de Impacto (FI):	165
5.6.6. Análises qualitativas das gônadas masculinas	170
5.6.6.2. Gônadas masculinas 50 PC	171
5.6.6.3. Gônadas masculinas - 50 PA.....	173
5.6.6.4. Gônadas masculinas – 500 PA	174
5.6.7. Análises Quali - Quantitativas das Alterações nas Gônadas Masculinas.....	175
5.6.7.2. Fator de Impacto (FI)	176
Fator de Impacto (FI):	176
Concentração 50 PA	177
Concentração 500 PA	178
5.7. Discussão.....	179
5.8. Conclusões	183
Referências	185

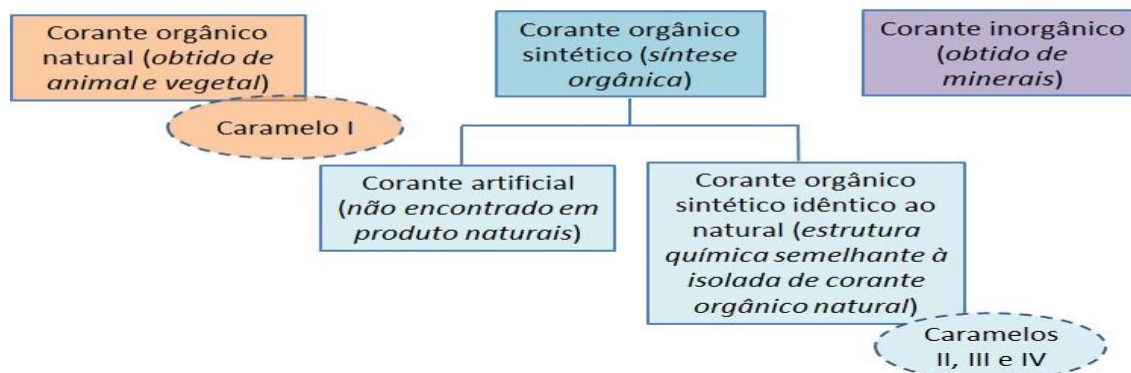
	14
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	191
Sugestões para novos trabalhos:	192

APRESENTAÇÃO

A utilização industrial dos corantes sintéticos alimentícios em detrimento dos corantes naturais tem se justificado pelo menor custo de produção, infinita possibilidade de síntese com grupos cromóforos e auxocrômicos diferenciados, que ampliam a diversidade de cores e tonalidades; com maior fidelidade da cor e maior fixação (Zanoni & Yamanaka, 2017). Entretanto, na aplicação do corante, a busca de tons específicos para um determinado produto, causa perdas do corante nos processos produtivos. Durante a aplicação, o corante, ou se dissolve ou tem sua estrutura cristalina destruída para manter-se no substrato através da adsorção, solvatação, ligação iônica ou covalente, o que pode refletir características em diferentes perfis toxicológicos e ambientais dessas substâncias (Shore, 2002), que serão ampliados através da produção em larga escala industrial.

As nomenclaturas dos corantes sintéticos são complexas. Nos alimentos e bebidas são classificados em corante orgânico natural, obtido a partir de vegetal ou animal, cujo princípio tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado; corante orgânico artificial, obtido por síntese orgânica, mediante o emprego de processos tecnológicos adequados e não encontrado em produtos naturais; corante orgânico sintético idêntico ao natural, cuja estrutura química é semelhante a do princípio isolado do corante orgânico natural; e corante inorgânico ou pigmento, obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados ao seu emprego em alimentos (CNNPA/MS, resolução n.44/77) (Figura 1).

Classificação de corantes **Resolução n° 44/CNNPA, de 1977**



Corantes azo

Estima-se que a produção mundial de corantes azo esteja em cerca de um milhão de toneladas por ano, e há mais de 2000 tipos diferentes desses pigmentos em uso (Chung, 2016); perfazendo mais da metade de todos os corantes no mundo (Elbanna et al., 2017) com amplo uso nas indústrias. Sua estrutura molecular apresenta cadeias orgânicas aromáticas e uma variedade de outros átomos que atuam como estabilizadores de dupla ligação entre nitrogênios com ampla versatilidade na molécula, possibilitando uma pigmentação duradoura e estável resistentes ao oxigênio, variações de temperatura e pH (especialmente quando usados em alimentos), além de assegurar uma distribuição eletrônica que garante a absorção da luz no espectro visível, fator-chave para a manipulação de corantes (Singh, 2015).

Como possuem elevada resistência à degradação pela luz e por microrganismos, com elevada solubilidade em água, determinam efeitos tóxicos à fauna e flora, dificultando a penetração da luz e a difusão de gases no meio aquático (Chung, 2016).

O corante chega aos corpos hídricos, por meio de perdas do processo produtivo e podem ser metabolizados por organismos aquáticos, acarretando a mesma toxicidade encontrada em pesquisas com cobaias e até na espécie humana, mas há carência de estudos ecotoxicológicos.

Atualmente, somente alguns trabalhos foram realizados com a espécie de peixe *Danio rerio*, um organismo onívoro, representante do topo da cadeia alimentar, indicado para pesquisas toxicológicas, mas estudos ainda são incipientes para avaliar o comportamento do corante sobre as populações aquáticas. Portanto, esta pesquisa realizou ensaios ecotoxicológicos com duas espécies bioindicadoras de diferentes níveis tróficos e analisou as multigerações dessas espécies sob a influência do corante, para entender se o corante, tão questionado para uso do ser humano pode, se presente nos ecossistemas aquáticos, comprometer sua dinâmica e causar efeitos irreversíveis na população.

A pesquisa foi realizada com dois tipos de corantes: padrão puro (100%) e padrão (comercial 86%), para verificar se os corantes possuem o mesmo grau de toxicidade, se lançados nos corpos aquáticos sem tratamento, e segue em forma de capítulos:

➤ **Capítulo 1: Artigo de revisão - Aspectos toxicológicos e ecotoxicológicos do azocorante alimentar amarelo tartrazina: uma revisão bibliográfica.**

Aborda as pesquisas realizadas até o momento, levando-se em consideração o valor da Ingestão Diária Aceitável para os seres humanos e cita os questionamentos do último encontro do Joint Expert Committee Food Additives - JECFA (2019) acerca das análises toxicológicas do amarelo tartrazina, além do levantamento ecotoxicológico do corante como fonte de possível poluição aquática, se lançado diretamente, sem tratamento prévio, em corpos hídricos.

➤ **Capítulo 2: Ecotoxicidade do corante alimentar amarelo tartrazina nos organismos teste *Daphnia similis* (Cladocera) e *Danio rerio* (Cyprinidae): ênfase em multigerações.**

Nesta pesquisa, reproduções de multigerações de dois organismos recomendados para análises de ecotoxicidade, *D. similis* e *D. rerio*, foram utilizados para análise da persistência do corante em organismos aquáticos. Foram realizados também, ensaios de recuperação biológica pós exposição ao corante, simulando uma biorremediação.

➤ **Capítulo 3: Ecotoxicidade do corante amarelo tartrazina em embriões de *Danio rerio* após exposição multigeracional.**

Foram realizados testes de toxicidade em *D. rerio* em exposição de 21 dias (geração F0) e onze meses (geração F1), ao corante amarelo tartrazina, para avaliar os potenciais efeitos reprodutivos em duas gerações consecutivas. Os peixes foram expostos aos corantes do Padrão Analítico 100% (PA) nas concentrações de 50 mg.L⁻¹ e 500 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ no Padrão Comercial 86% (PS). Essas concentrações foram estabelecidas de acordo com os valores mínimos e máximos permitidos nos alimentos, de acordo com o Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares (CCFA). Neste trabalho, os embriões expostos em 3 hpf (horas pós-fertilização) e 24 hpf, foram analisados morfológicamente e as deformidades foram fotografadas e quantificadas.

➤ **Capítulo 4: Ecotoxicidade do corante amarelo tartrazina em larvas de *Danio rerio* após exposição multigeracional.**

Foram realizados exposições da geração F0 em ensaios crônicos de 21 dias nas concentrações de 50 mg.L⁻¹ e 500 mg L⁻¹ Padrão Analítico (PA) e 50 mg L⁻¹ Padrão Comercial (PC), seguidos de reproduções que resultaram na geração F1. Aos onze meses de idade, a geração F2 foi obtida através de testes de acasalamento da geração F1. Os parâmetros morfológicos das larvas foram avaliados em 48, 72 e 96 hpf (horas pós-fertilização) e as deformidades fotografadas.

➤ **Capítulo 5: Histopatologia quali-quantitativa de gônadas femininas e masculinas em *Danio rerio* submetidos à ensaios crônicos com o azocorante alimentar amarelo tartrazina**

Exposição de *D. rerio* aos corantes amarelo tartrazina: padrão analítico (PA) e padrão comercial (PC) em ensaios crônicos de 21 dias, após o qual foram sacrificados para análises histológicas de suas gônadas femininas e masculinas, com o objetivo de quantificar e qualificar as alterações desencadeadas pela exposição ao corante e avaliar os possíveis efeitos danosos para a espécie.

➤ **Conclusão geral**

Na conclusão geral, serão consideradas as conclusões de cada artigo e a finalidade é contribuir com os dados literários existentes para auxiliar na tomada de decisão sobre o uso do azocorante como aditivo alimentar.

Capítulo 1: Artigo de revisão

Toxicological and ecotoxicological aspects of tartrazine yellow food dye: a literature review.

Aspectos toxicológicos e ecotoxicológicos do azocorante alimentar amarelo tartrazina: uma revisão bibliográfica.

Silva, J. & Fracácio, R.

Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Brazilian Journal of Environmental Sciences)

Received on: 04/14/2020

Accepted on: 09/01/2020

Resumo

O aditivo amarelo tartrazina é legalizado para aplicação em produtos alimentícios de consumo humano, no valor da Ingestão Diária Aceitável - IDA de 7,5 mg/kg de peso corpóreo por dia (Joint Expert Committee on Food Additives - JECFA), no entanto estudos o descrevem como tóxico. O corante, usado intensamente na indústria e comércio adentra no ambiente aquático por meio de lançamentos de efluentes sem tratamentos ou de tratamentos inadequados para a remoção do corante, mas há poucas pesquisas ecotoxicológicas. Portanto, esta pesquisa elencou estudos cujos efeitos tóxicos da exposição ao referido corante se desenvolveram em seres humanos, cobaias, e *Danio rerio*, (peixe com bases moleculares e genoma similares aos humanos). Concluímos, de acordo com a literatura, que mesmo em doses permitidas para a IDA ou menores, há evidências de efeitos tóxicos para diferentes organismos, fases de vida e tempos testados e estes valores podem não ser protetivos à vida aquática; em um trabalho de exposição de *D. rerio* desde embriões até larvas mantidos em concentrações de 0,05 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹ na tartrazina pura e comercial, observou-se que na menor concentração, houve efeito ecotoxicológico em embriões e em larvas após 48 horas da eclosão, por meio de alterações como edemas cardíacos, no saco vitelínico, escoliose e distorções na cauda.

Palavras-chave: CENO, aditivo alimentar, legislação ambiental, *Danio rerio*, mutagenicidade.

Abstract

The use of the yellow additive tartrazine in food products for human consumption is permitted within an Acceptable Daily Intake - IDA of 7.5 mg/kg of body weight per day (Joint Expert Committee on Food Additives - JECFA). However, studies have described this as a toxic component. The dye, used intensively in industry and commerce, enters the aquatic environment through releases of non-treated, or inadequately treated effluents, but further ecotoxicological researches are needed. Here we addressed studies reporting the toxic effects of exposure to this dye developed in humans, guinea pigs, and *Danio rerio* (a fish with molecular bases and genomes similar to humans). Based on this review, we concluded that at doses allowed for IDA, or even lower, toxic effects can be evidenced for different organisms, life stages, and tested times. The reported values may not be protective to aquatic life; in a work of exposure of *D. rerio* from embryos to larvae kept at values lower than 0.05 g.L⁻¹ and 0.5 g.L⁻¹ for pure and commercial tartrazine, it was observed that in the lowest concentration, there was ecotoxicological effect for embryos and larvae 48 hours after hatching, and implied in cardiac edema, changes in the yolk sac, scoliosis, and tail distortions.

Keywords: CENO, food additive, environmental legislation, *Danio rerio*, mutagenicity.

1.1. Introduction

Colors fascinate human perception. In food, they are related to health and taste, and although these additives do not add nutritional value to the food, their use is intended, among other purposes, to intensify the natural color and to extend their shelf life (Freitas, 2012; Anastácio et al., 2016). Among the dyes, the most used are those from the azo group ($-N=N-$), due to their high solubility, low cost, and better fixation on food. This group represents more than 65% of the commercial dyes (Zanoni and Yamanaka, 2017). In Brazil, eleven artificial organic dyes are allowed, of which six are azos: tartrazine yellow, twilight yellow, amaranth, azorubin, ponceau 4R, and red 40.

The application of these additives to food must not exceed the maximum allowed by the legislation (0.05g.100 mL) (ANVISA, 1999). However, for quantitative analyzes of dye intake by the population, it is necessary to identify the food products with additives in the consumer's diet; to estimate the concentration of the additive in these products, and to know the daily consumption, which should not exceed the Acceptable Daily Intake (JECFA). For the yellow dye tartrazine, one of the most used in the food industry, the value of the IDA is 7.5 mg.kg of body weight.day, which would not cause health risks.

Morais (2010), studied individuals prone to allergic rhinitis, bronchial asthma, urticaria, or sensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs, giving them daily IDA doses of tartrazine yellow, for seven days. He observed that these individuals had significant reduction in the peak of expiratory flow, and presented angioedema, nasal congestion, rhinorrhea, wheezing, itchy skin and urticaria, corroborating the data obtained by Doguc et. al., 2013; Khayyat et. al., 2017; Bhatt et. al., 2018.

Corder and Buckley III (1994) proved in clinical respiratory studies, that patients sensitive to tartrazine, developed bronchoconstriction with a consequent decrease in respiratory volume. There is a group of people whose sensitivity to this dye is manifested as asthma, urticaria, and hypersensitivity to tartrazine, which occurs in approximately 3% of the population, mainly in individuals sensitive to salicylates. As the chemical structure is close to that of benzoates, salicylates, and indomethacin, there is the possibility of allergic cross-reactions (Polônio and Peres, 2009). Matsuo et al. (2013) analyzed the effect of tartrazine on the release of histamine (a hormone responsible for several allergic symptoms) in basophils (important cells of the immune system) of individuals who had chronic allergy-related conditions, such as urticaria.

Tartrazine has also been linked to behavioral changes, such as attention deficit and hyperactivity. Baternan et al. (2004) used dye mixtures in the presence of sodium benzoate in a double-blind experimental study using placebo in children of preschool age, and demonstrated that artificial dyes have a relevant influence on the hyperactive behavior of children aged about three years old.

Al-Shabib et al. (2017) showed that tartrazine can cause amorphous aggregation of proteins when they are in cationic form, which is known to cause various diseases and metabolic irregularities.

Sasaki et al. (2002) proved the occurrence of DNA damages in the colon of mice in a comet assay, at doses of 10 mg.kg.pc.day (mg per kilogram of body weight per day), and concluded that the azo dye, when ingested, is absorbed by the intestinal epithelium and is metabolized by azo-reductases elaborated by microorganisms from the intestinal flora, and by the hepatic reductases, that convert it into aromatic amines.

As toxicological effects were detected in humans and guinea pigs, it is likely that its release in water bodies can interfere with aquatic biota. Some works were performed with the organism *D. rerio*, an experimental model widely used in various biological, biomedical, toxicological, and ecotoxicological researches because of its 70% genetic homology with humans, and due to the advantages provided by its transparent embryos, that permit detailed analyses of its development. These studies showed that the dye is harmful to embryos and larvae, for which development was negatively affected (Joshi and Pancharatna 2017; Gupta et al., 2019, Jiang et al., 2020, Silva and Fracácio, 2020 in press).

Despite the existence of maximum acceptable limits for daily human intake in national and international legislation, there is still no specific legislation for safe limits of food dyes for the discharge of effluents into water bodies aiming at the protection of aquatic life. Studies have indicated that approximately 12% of the amount of synthetic dyes are lost during manufacturing and processing operations (Anunciação et al., 2015), and this is one of the industrial sectors that is growing the most. In 2019, according to the Brazilian Food Industry Association - ABIA), there was a 2.3% growth with revenues of approximately \$ 700 billion. Currently, in the state of São Paulo, Bill 333/2012 prohibits the release of dyes in rivers, lakes, dams, and other freshwater bodies without proper treatment. It includes the dyes as contaminating substances and, thus, contribute to a greater control over the water quality and public health.

According to the above information, the present work intends, through literature data, to evaluate whether the conditions and limits of use established for the yellow dye tartrazine are safe for aquatic environments. Therefore, we intend to answer: 1. What is the relationship between the human use of the dye and the impact on aquatic environments? 2. Are there safe exposure concentrations for the protection of aquatic life in the literature that can be used as a basis? 3. What are the main biological effects to test organisms? This review aims to contribute to further clarification on the interactions between tartrazine yellow food coloring and humans, and also between tartrazine and aquatic life.

1.2. Methodology

A review was carried out using the databases PubMed (National Library of Medicine of the United States) and CAPES journals (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), for the period from 2010 to 2020. We were interested in the effects of the Tartrazine in both humans and aquatic life. For their impacts on humans, the keywords “Toxicity” and “Tartrazine Food” were used. For aquatic life, the used keywords were: “Ecotoxicology” “Tartrazine Food”; “Ecotoxicology” “Tartrazine dye” and “Ecotoxicology” “Tartrazine dye” Zebrafish”. The searches returned 235 articles, of which only four were on aquatic life. The 231 articles on humans passed through further selection criteria, being eliminated if they: 1) dealt only with dye degradation; 2) analyzed other dyes simultaneously, which could imply in synergistic processes; 3) used food to analyse the toxicity (this is because foods rarely contains only one color and many foods contain other forms of additives that would require further study); 4) toxicity was not significant or doubtful.

1.3. Composition and chemical structure of the tartrazine yellow dye

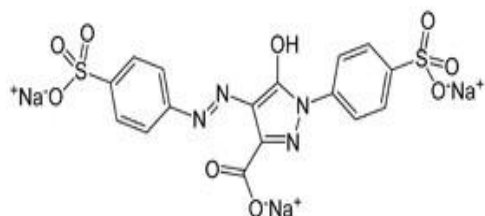
Tartrazine yellow is a regulated artificial organic dye, used by several industrial segments. It is prepared from diazotization of 4 - amino - benzene acid with nitric acid and sodium nitrite. The diazo compound is coupled with 4,5-dihydro-5-oxo-1- (4-sulphophenyl) - 1H-pyrazole-3-carboxylic acid or with methyl ester, or ethyl ester, or a salt of carboxylic acid, which is isolated and purified as the sodium or calcium salt (FDA 21 CFR74.705). As the main non-colored components it is possible to find sodium chloride and / or sodium sulfate in its composition.

The degree of purity of the dye should not be less than 85% in total color components (calculated as sodium salt) and the remaining 15% can be composed of sodium chloride or sodium sulfate (which is never explicitly mentioned). The water-insoluble matter must not exceed 0.2% and the subsidiary coloring no more than 1.0% with 0.5% organic compounds (hydrazobenzene 4-aminobenzene-1-sulfonic acid, 5- oxo-1- (4-sulphophenyl) -2-pyrazoline-3-carboxylic acid, 4,4'-diazoaminodi (benzene sulfonic acid), tetrahydroxysuccinic acid). Non-sulfonated primary aromatic amines can be present at levels of $\leq 0.01\%$ (calculated as aniline), originated in the manufacturing process.

In the manufacturing of the dye, impurities can reach 10% in the final compound (Resende, 2015) and many of them are metals, 4-aminobiphenyl, 4-aminoazobezene (sulfanilic acid) and benzidine (aromatic amine, formed by the oxidation of aniline). In the process of benzidine diazotization, a small part remains as free benzidine, but the majority remains in the form of subsidiary dyes such as the diazo benzidine T - pyrazolone dye. (Figure 1). According to Prival et al. (1993); Davis and Bailey, (1993), if these compounds are present in the dye and if mammals consume it, they will be reduced in the intestine releasing benzidine in its free form. Compounds like benzidine are considered mutagenic and / or carcinogenic, since through their metabolism the electrolytes interact with DNA and induce mutations or generate tumors (Mathur et al., 2012).

The high solubility of the dye is due to the azo bond to two sulfonic groups, in addition to the functional group carboxylic acid (Al-Shabib et al., 2017). They have a high standard of fixation, resistance to light and humidity and variations in pH and oxygen (Hunger, 2003; Shore, 2002; Zollinger, 1991). It can be identified through UVVIS spectrophotometry, wavelength close to 426 nm (Directive 95/45 / CE, 1995). This characteristic occurs due to the presence of chromophores, carboxylic, nitro, hydroxy and amino groups that are capable of increasing the specific absorption intensity (Del Giovine; Bocca, 2003) (Figure 1).

Figure 1. Structure of the dye azo tartrazine yellow



Usual name: Tartrazine yellow.

Chemical Name: Trisodium salt 4,5-dihydro-5-oxo-1 (4-sulfophenyl) -4- [4-sulfophenyl-azo] -1H-pyrazol-3-carboxylate.

Synonyms: Tartrazine; FD & C Yellow No. 5, Food Yellow No.4. Class: Monoazo.

Molecular Formula: C₁₆H₉N₄Na₃O = S₂.

Molar Mass: 534, 35781. CAS: 1934-21-0.

Number Color Index: (C.I.) 19140.

Maximum Absorption λ_{max} : = 426nm.

Solubility in water: 38 mg / L at 2 ° C, 200 mg / L at 25 ° C. LD 50 - 2,000 mg / kg, in mice (at this dosage, research has shown genotoxic damage).

Fonte: Prado & Godoy (2003); Cosmoquímica Indústria e Comércio (2009)

1.4. Regulations on the use of tartrazine yellow dye

1.4.1. Human food

In 1943 the United Nations Conference on Agriculture and Food created FAO - United Nations Food and Agriculture Organization. In 1948, FAO formed the first group of experts with responsibilities on human health to establish food standards, FAO / WHO, which in 1956 promoted the creation of the JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives, whose functions are to: 1. assess the risks of consumption by animals and humans; 2. assign functional classes; 3. check the identity and purity specifications; 4. evaluate methods of analyses and develop standards or codes, such as labeling.

In 1961, FAO and WHO created the Codex Alimentarius (CA) in an attempt to establish an international standard for the use of these additives. Codex Alimentarius also resulted in the formation of the Codex Committee on Food Additives (CCFA), a group specialized only in food additives that establishes the maximum permitted levels of these products and acts together with JECFA.

In 1989 Codex Alimentarius FAO / WHO created the International Numbering System (INS - International Numbering System, Codex Alimentarius FAO / WHO), with the purpose of providing an international numbering system for identifying additives in lists of food ingredients, and also the use of the specific name of the additive (CI name), based on the identification number (CI). INS does not require toxicological approval of the substance.

In 2001 EFSA, the European Food Safety Authority, was created, providing independent scientific advice on the risks associated with food. These risks can be existing or emerging.

The Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) guides the Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) on the use of food dyes and this committee meets every two years to assess, among other demands concerning food, food additives.

In Brazil, the National Health Surveillance Agency (ANVISA), is the agency responsible for regulating the use of dyes, based on the principles of risk analyses of EFSA. ANVISA establishes the maximum limits and the types of foods in which dyes can be applied without offering risk to human health. ANVISA carries out inspection activities through the Standing Committee on Food Additives (CPAA) (Fávero et al., 2011).

In 1999, ANVISA, through Resolutions 382 to 388 of 9 August, determined the permission of only eleven artificial colors in Brazil, among them, the yellow tartrazine, which must, mandatorily, have its name declared in full on the labels of the products (Resolution No. 340 of 12/13/2002 (ANVISA / MS - Ministry of Health). The additive is listed in Annex III of Resolution 04/88 of CNS / MS (National Health Council / MS) that allows its use in food, at acceptable daily intake - 7.5 mg / kg body weight (JECFA), this means, for example, that a 30 kg child can consume up to 225 mg of tartrazine per day, and an adult of 60 kg can consume up to 450 mg per day of the dye without likely health risk.

In 2005, ANVISA, through the Resolution of the Mercosur Group, GMC n. 11/2006, adapted the technical regulations on food additives within the scope of MERCOSUR.

On 5/22/19 ANVISA, through Resolution No. 285/2019, prohibited the use of food additives containing tartrazine, aluminum lacquer. Lacquers are preparations of salt, from the dye (Resolution No. 37 of 1977), it is a combination with the basic radical of aluminum, calcium and/or sodium, and can be sold under the name aluminum, calcium and/or sodium lacquer, and are used on confectionery surfaces, processed cheeses, melted cheeses, soups, chemical yeast present in flours, pastries and pizza doughs, as well as bread and cookies, among many other food products.

1.4.2. Regulation for discharge of effluents with dyes

Synthetic dyes fall into the category of emerging pollutants, which are defined as any chemical substance that has not been included in monitoring programs, nor in legislation relevant to environmental quality, but is constantly being introduced into the environment due to anthropic activities (Horvat et al ., 2012).

Synthetic organic dyes, most of which are recalcitrant, are used universally in different manufacturing processes. The dyes are released into the environment in industrial effluents and are highly visible even at low concentrations(<1 mg/L) (Almeida et al., 2004).

The determination of color in liquid samples is based on the methodology proposed in the Standard Methods - American Water Works Association (AWWA, 2005), whose principle is the determination of the color spectrophotometrically in a wavelength range between 450 and 465 nm, using a standard solution of platinum-cobalt (Pt-Co), however, effluents whose colorations of the samples are very intense, hinder the satisfactory application of the method, and in practice, they are diluted to samples with strong colors so that they can be measured on the curve scale standard 0.005 and 0.8% Abs (AWWA, 2005), also, different dyes with equal concentrations can present visually different color intensities or even completely different shades (Beltrame, 2006).

In the case of Brazil, there is still no specific legislation that defines color standards for effluents. However, in CONAMA 357/2005, Art.15-III and Art.16-I, it is understood that, in the absence of defined standards, one should adopt the standards available for the class in which the receiving bodies are included. Thus, for freshwater bodies classified as Classes 2 and 3, the tolerable value of real or true color would be up to 75 mg Pt / L (platinum scale per liter). CONAMA 430/11, in its article 18, shows that the effluent of any nature should not have the potential to cause toxicity in the aquatic biota.

1.5. Tartrazine toxicity

1.5.1. Toxicity assessment by the JECFA Commission

The yellow dye tartrazine was first evaluated in 1966 by JECFA experts in food additives, and later in 1975 and 1984 by the Scientific Committee for Food (SCF), when the value of the IDA was set at 7.5 mg/kg/pc/day for humans. In a more recent meeting (JECFA, 2017), the committee reassessed this value, analyzing some research produced in recent years.

The Committee considered that toxicological research in recent years is insufficient to alter the value of the IDA, considering that tartrazine is not highly toxic. The analyzes took as a toxicity parameter three studies, that of Sasaki et al., (2002), who described an LD50 value greater than 2000 mg/kg / pc / day in studies with mice; that of Borzelleca and Hallagan (1988a), performed with mice for 104 weeks, in which NOAEL - Unobserved Adverse Effect Level of 9735 mg/kg / pc/day was established, and that of Borzelleca and Hallagan (1988b), with rats at maximum exposure of 125 weeks, in which the NOAEL of 2641 and 3348 mg/kg day was established.

A study by Axon et al. (2012) concluded that the dye can act as an activator of estrogen receptors (xenoestrogen), increasing the risk of primary biliary complications and cirrhosis in postmenopausal women. However, according to the Committee's evaluation, it is unlikely that consumption could reach the levels of exposure (220 and 160 nM) used in the research.

Research by Patterson and Buther (1982), reported a significant increase in chromosomal aberrations in fibroblastic cells of *Muntiacus muntjac* in vitro (5 to 20µg/mL), but did not report cytotoxicity.

Maekawa et al. (1987) studied concentrations of 0%, 1% or 2%, administered in rats and were statistically significant, presenting mesothelioma in the abdominal cavity in males and stromal polyps of the endometrium in females, but the incidence of these tumors was not dose-dependent and was within the historical control range for these tumors and within this strain of mice, according to the authors.

Mpountoukas et al. (2010) studied human peripheral blood cells in concentrations of 0.02 and 8 mM and did not find genotoxicity, but in high concentrations (4.0 and 8.0 mM), there was cytotoxicity (which can cause cell death) and the dye also demonstrated ability to bind to DNA

Tartrazine would have the ability to bind to human and bovine serum albumin, forming a complex with these proteins, potentially limiting their physiology and function (Pan et al., 2011), but tartrazine is poorly absorbed and this effect would probably not have an important role; only in case of greater exposure or association with other dyes or drugs capable of binding to plasma or proteins.

Toxicity research in rats showed significant changes in some blood parameters, indicative of liver and kidney malfunction (Aboel-Zahab et al., 1997; Moutinho et al., 2007; Amin et al., 2010; El -Wahab & Moram, 2013; Ghonimi & Elbaz, 2015). However, the daily ingestion of 8103 mg/kg/day and 9735 mg/kg/day in males and females, respectively, during 104 weeks, resulted in no adverse effects (Borzelleca and Hallagan 1988b).

Another issue raised by the Commission was the difficulties in the toxicity analyzes of the tartrazine dye when studied in mixture with other dyes (Giri et al., 1990; Pollock and Warner, 1990; Collins et al., 1990, 1992; Aboel-Zahab, 1997; Sasaki et al., 2002; McCann et al., 2007; Elhkim et al., 2007; Axon et al., 2012; El-Warab & Moran, 2013; Ceyhan et al., 2013; Saxena & Sharma, 2014, 2015; Erickson et al., 2014), due to the interactions that can occur between chemical substances.

The Committee criticized the relevance of some in vitro genotoxicity tests due to the observation that the azo linkage and desulfonation in the metabolic products tested were not broken and noted that the potential for tartrazine to cause mutations are occasional cases, which, if present, would be directed to cells lining the intestine during the transit of metabolites before excretion in the feces. The committee cites a personalized protocol for the reverse mutation assay, using flavin mononucleotides to accelerate azo-reduction in hamsters, with a lesser tendency to inactivate azo-reduction products and which produced negative results (Prival and Mitchell, 1982; Prival et al, 1988).

In assessing the reproductive parameters and offspring development, the Committee's report cites again the work of Borzelleca and Hallagan (1988a,b). The Committee concluded that the administration 2641 and 3348 mg/kg/pc/day did not affect rats reproduction. Tanaka (2006) also found no neurotoxic effects after providing doses of 83, 259, and 773 mg/kg/day during five to nine weeks to F0 and F1 rat lineages.

Neurological studies in juvenile mice and rats that received tartrazine orally at doses of up to 700 mg/kg/pc/day for 30 days, revealed some neurobehavioral and neurochemical effects (Gao et al., 2011), but the Committee noted that only a small number of animals per group/dose was used and in very high doses, which prevented the use of these studies for evaluation; Ceyhan et al., (2013) administered tartrazine with an IDA dye mixture (7.5 mg/kg/pc/day) in female rats, before and during pregnancy, but no effects on reproductive parameters were observed.

Collins et al. (1990) (1992) administered doses of 60, 100, 200, 400, 600, and 1000 mg/kg/pc/day in pregnant rats from 0 to 19 days of gestation, but no maternal toxicity or dose-related effects prevented fetal development. Subsequently, the dye was administered to rats throughout the gestational phase, in doses of 0.5; 0.1; 0.2; 0.4; 0.7% diluted in drinking water and 67.4; 131.8; 292.4; 567.9 and 1064.3 mg/kg/pc/day in food, and there were also no changes in viability, size, weight, or teratogenic effects on fetal development.

In humans, many reports concluded that the yellow tartrazine dye causes reactions of intolerance or hypersensitivity. However, the reports analyzed by the Committee were of foods consumed by the population, which rarely contain only the dye, but a mixture of dyes. In the study of Elhkim et al. (2007) these symptoms were observed in only 0.12% of the analyzed population, which was considered poorly relevant by the Committee.

Based on studies relating the consumption of food and drinks containing tartrazine with hyperactivity in children (Pollock and Warner, 1990; Bateman et al., 2004; McCann et al., 2007; Stevenson et al., 2010), the Committee warned about the presence of the substance sodium benzoate in these products. However, these studies were considered limited due to inconsistencies in the conclusions and due to the use of mixtures of food dyes.

JECFA (2017) gathered studies on the exposure to food with tartrazine carried out in the European Union (EFSA, 2009, 2015); United States (Doell et al., 2015; IACM, 2015); Australia (FSANZ, 2012); France (Elhkim et al., 2007); Ireland (Connolly et al. 2010); Hong Kong (Lok et al., 2010); India (Dixit et al. 2011); Indonesia (Anisyah et al. 2011), and South Korea(Choi, 2012; Ha et al., 2013).

These studies were performed using various concentrations, and respected the dietary culture of each country. EFSA concluded that the maximum exposure for children aged 1 to 10 years should be 0.4 to 7.3 mg/kg/day, and that exposure to tartrazine by the population in general does not present a health concern.

1.6. Evaluation of tartrazine ecotoxicity

Dyes have a high organic load that, in many cases, depletes dissolved oxygen and cause changes in the biological community. Its presence in water bodies affects from microalgae, which are the base of the aquatic food chain, to the top trophic level, humans. The accumulation of algae can cause eutrophication, a phenomenon that occurs when the environment receives higher concentrations of nutrients, mainly nitrogen (present in the chemical constitution of azo dyes such as nitrogen, nitrites, and nitrates), and excessive increases in algae and cyanobacteria may release toxins (Matsuzaki et al., 2004).

There is little ecotoxicological research with the yellow dye tartrazine, except for those by Joshi and Pancharatna (2017) that present values of CENO and CL50, and Jiang et al (2019) that present LC50 value for the species *D. rerio*. In this context, Silva and Fracácio (2020) studied the development of *D. rerio* embryos and larvae in concentrations of 0.05 g.L⁻¹ and 0.5 g.L⁻¹ of analytical tartrazine (100%), and commercial standard 86% and at a concentration of 0.05 mg.L⁻¹. They observed loss of viability of the eggs after 24 hours of fertilization, and from 48 to 72 hpf there was no hatching and deformities such as edema of the yolk sac, cardiac edema, distortion of the tail, lack of pigmentation and decreased heart rate, indicating ecotoxicity at the said concentrations. This work shows ecotoxicological effects in concentrations below those presented by other works available in the literature.

1.7. Results

1.7.1. Analyses of toxicological literature

After the application of the manuscript selection criteria, 29 articles were considered, being four of them on ecotoxicology.

The biggest concern regarding the use of tartrazine azo dye is its reduction to aromatic amines (Demirkol et al., 2012). This mechanism is responsible for several disorders such as anemia, pathological lesions in the brain, liver, kidney and spleen, in addition to allergic reactions, tumors and cancer. Changes in serum albumin in humans also compromise biological functions (Pan et al., 2011) and in molecular toxicology studies, tartrazine has bound to the central hemoglobin cavity (Basu and Kumar, 2016b).

Liver enzymes increased in rats administered with tartrazine, suggesting lesions and impairment of liver cells, cytoplasm and mitochondrial organelles (Amin et al., 2010; Himri et al., 2011; Khayyat et al., 2017).

In reproductions, tartrazine induced a marked deficiency in antioxidant biomarkers (SOD, catalase and GSH) in groups of young male rats (Mohamed et al., 2015). Tartrazine also induced adverse effects on the memory and learning of rats (Gao et al., 2011), hyperactivity, antisocial behavior and anxiety in male rats (Kamel and El-lethey, 2011).

The largest number of studies regarding dye toxicity was carried out with rats, (13 articles); cellular components or blood of human beings (4 articles); mice (3 articles); hamster (1 article) and others such as *Allium cepa*, calves, and horses (4 articles covering these groups) (Table 1).

Table 1. Researches carried out in the last ten years with the yellow dye tartrazine that resulted in toxicity.

Author (s)	Objectives	Dose	Conclusions
Amin et al., 2010)	To evaluate the toxic effects of tartrazine dye, by biomarkers of oxidative stress the kidney and liver of rats.	15 mg/Kg and 500mg/Kg/pc/day, in rats (<i>Rattus norvegicus</i>) for 30 days.	•Blood and enzymatic changes • Significant weight loss •Reduction of liver antioxidants •Increased oxidative stress • Decreased activity of superoxide dismutase (a cellular antioxidant enzyme).

Morais (2010)	To evaluate the toxic effects of tartrazine dye in people with respiratory problems and sensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs.	Doses of 5 mg, 10 mg, and 20 mg of the additive in 77 subjects for seven days.	• Reduction in peak expiratory flow; itchy skin and hives; • Immune system reactions affecting the skin and airways.
Mpountoukas et al. (2010)	To evaluate the toxic effects of tartrazine dye in human peripheral blood cells with the dye.	0.02 - 8.0 mM (0.01 g.L ⁻¹ - 4.27 g.L ⁻¹) peripheral blood cells in vitro (for 72 hours).	• The dye changed the rates of mitotic division at high concentrations (4.0 and 8.0 mM); • High cytotoxicity (which can cause cell death); • The dye also demonstrated its ability to bind to DNA.
Gao et al., (2011)	To evaluate the toxic effect of tartrazine on learning and memory functions in mice and rats.	Kun ming mice and Sprague dawley 175, 350 and rats 700 mg/kg of tartrazine by body weight once daily for 30 days per gavage.	• Oxidative damage to the brain; • Decline in catalase, glutathione activities; peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD); • An increase in the level of malonaldehyde (MDA), which resulted in adverse effects on learning and memory functions that can be attributed to the increase in lipid peroxidation products and reactive oxygen species, inhibiting antioxidant defense enzymes.
Kamel and El-Lethey (2011)	Address the influence of	0%, 1% and 2.5% administred to male	• Tartrazine-treated rats showed hyperactivity

	different doses of tartrazine exposure to levels of hyperactivity, anxiety, depression and antisocial behaviors in rats.	Wistar rats for 16 weeks.	• The anxiogenic effect of tartrazine was evident; • Ingestion of tartrazine promoted significant depression, expressed by prolonged immobilization during forced swim test; • Compromised social interaction.
Kashanian and Zeidali (2011)	To address DNA interactions of the cells of a calf's thymus and its interaction with Tartrazine.	10 nM of the dye	• The DNA - tartrazine interaction affected the helical structure of the DNA, in addition to showing an easier connection between tartrazine and denatured DNA. The DNA bound to the dye underwent changes.
Pan et al., (2011)	To test the molecular link between plasma albumin and tartrazine.	Human albumin and bovine albumin at concentrations of 5.0×10^{-5} mol.L ⁻¹ and tartrazine at concentrations of 1.0×10^{-5} mol.L ⁻¹ .	• Tartrazine can bind to albumin spontaneously, and form a complex, with Van der Waals bonds and hydrogen bonds • Tartrazine alters the conformation of the protein.
Himri et. al., (2011)	To address oral toxicity in Wistar rats;	7.5; 10 mg /kg/pc/day with 3.75 mg/kg/pc/ day of sulphanilic acid.	• Liver increased by 10 mg/kg/pc/day; • Changes in the kidneys • In high doses, tartrazine can induce oxidative stress through the formation of free radicals.

Demirkol et al. (2012)	To evaluate changes in oxidative stress parameters, such as glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase. Activity (GPx) and catalase (CAT) in hamster ovary cells.	Chinese hamster cells (CHO) (10 x 10 ³ cells) exposed in tartrazine concentrations of 10, 100, 500, 1,000, 2,000 µM (5.34; 53 , 43; 267.15; 534.3; 1068 g.L ⁻¹) (3, 8, 12 and 24 h)	• Depletion of GSH (one of the main antioxidant cells), causing oxidative stress (oxidative stress plays an important role in sclerosis, chronic lung disorders, paralysis, rheumatoid arthritis, age-related degenerations and disease Alzheimer's disease).
Gomes et al. (2013)	To address cytotoxic effect of tartrazine on the cell cycle of <i>Allium cepa L.</i>	0.4 and 4.0 mL in <i>Allium cepa L</i> roots, in 24 and 48 hours exposures.	• Mitotic analyzes of the doses and exposure times evaluated were cytotoxic to the cells.
Ghonimi and Elbaz (2015)	To evaluate histological changes in selected Tissues of Wistar rats after ingestion of tartrazine with a protective effect of royal jelly and cod liver oil.	Adult Wistar rats administered at doses of 500 mg/kg/pc/day and 300 mg/kg/pc/day + royal jelly; 0.4 mg/kg/pc/day + cod liver.	At 500 mg/kg/pc/day, necrosis of liver tissues; hyperplasia of interstitial connective tissue; vacuolations in brain tissues; degenerative changes in the stomach mucosa; degeneration in the renal tubules. The curative protective effect of royal jelly and cod liver was not significant against the jelly
Mohamed et al. (2015)	To evaluate the possible neurotoxic effect of tartrazine as well as to determine the potential modulating role of	Evaluate rat pups in five different groups: a) 300 mg/kg/pc/day + royal jelly; b) 0,4 mL/kg/pc/day + cod liver oil; c)	• Significant decrease in the concentration of brain neurotransmitters • Marked scarcity in the level of antioxidant biomarkers • These parameters were more recovered in the tartrazine groups with royal jelly and tartrazine with cod

	cod liver oil and royal jelly in protecting against dye	500 mg/kg/pc/day tartrazine;d) 500 mg/kg/pc/day + royal jelly; e) 500 mg/kg/pc/day + royal jelly + cod liver oil.	liver oil, which provided sufficient protection against the effects of tartrazine on function and structure of the puppies' brain tissue.
Soares et al. (2015)	To evaluate the potential effects of cytotoxicity, genotoxicity on DNA.	Human lymphocytes exposed to 0.25 - 64.0 mM dye (0.13 - 34.19 g.L ⁻¹)	• Tartrazine did not show cytotoxicity, however it did show genotoxicity.
Basu and Kumar (2016)	To test interaction of tartrazine with human hemoglobin.	Hemoglobin concentration determined through a molar absorption coefficient of 1.79.000 M ⁻¹ cm ⁻¹ at 405 nm, where the tartrazine solution was injected.	• The dye significantly interfered with the helical stability of hemoglobin and probably the absorption of tartrazine and its metabolites in the blood plasma affected the function of hemoglobin, compromising its activity.
Golli et al (2016)	To evaluate the toxic potential of food tartrazine in different tissues of adult rats: blood, liver, kidneys and spleen.	Tartrazine was administered orally at a dose of 300 mg/kg/ pc/day in adult male Wistar rats over a period of 30 days.	• Increase in platelets, reduction in peripheral lymphocytes and TCD8 lymphocytes of the spleen; • Increased activities of hepatocellular enzymes that promoted changes in renal biomarkers; • Critical oxidative changes in all organs; • Enzymatic changes.

Al-Shabib et al. (2017)	To study of the interaction of tartrazine with myoglobin protein at two different pH	Equine myoglobin was prepared in 20 mM and tartrazine in concentrations of 0.0 to 10.0 mM. (5.34 g.L ⁻¹)	• The anionic sulfate group of tartrazine electrostatically interacted with myoglobin cationic amino acid residues leading to aggregation.
Meyer et al. (2017)	To study the transcriptional function of the human estrogen alpha receptor in an in vitro cell model.	Transgenic mice administered at doses 50 mg/kg/pc/day.	• Increased serum alkaline phosphatase activity and mild periportal fibrosis; • Sulphotransferase in the excretion of bile acids caused periportal inflammation and liver pathology.
Abo-El-Sooud et al. (2018)	To evaluate the daily administration of dye in hepato-renal and DNA changes in rats.	Administered orally to rats, 10 times the acceptable daily dose (IDA) for 60 days.	• Significant increases in the DNA nucleus; • Histopathology of the liver and kidneys showed destructive and degenerative changes that can cause genotoxicity and hepato-nephropathy.
Bhatt et. al. (2018)	To test the effect of the dye on the neurobiochemistry network of Wistar rats.	7.5 mg/kg by body weight through gavage for 40 days.	• Decreased activity of Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), considering that there was a decline in Glutathione-Stransferase (GST) Glutathione Reductase (GR); • Levels of ADI in the dye affect and alter biochemical markers of brain tissues and cause oxidative damage.
Floriano, et. al. (2018)	To evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of tartrazine in human leukocyte culture.	Concentrations of 5, 17.5, 35, 70, 100, 200, 300, 400, and 500 µg mL ⁻¹ in leukocyte cultures.	• At a concentration of 70 µg mL⁻¹, the dye induced DNA damage.

Abd-Elhakim et al. (2019)	To study the fibrogenic fibers of rats triggered by tartrazine, through tests with dye and chlorophyll.	The rats were administered ten times the acceptable daily intake of tartrazine or chlorophyll for 90 consecutive days.	● Increase in mRNA and immunohistochemical localization of renal fibrotic markers and liver collagen; ● Differences in AST, ALP, creatinine and urea levels; ● Decline in SOD, CAT and GSH enzymes in kidney and liver.
Hashem et. al. (2019)	To determine the effect of tartrazine dye on fetal development.	Daily administration of 0.45 and 4.5 mg/kg /pc/day tartrazine, in the fetal development of Wistar rats from the 6th to the 15th day of gestation.	● Liver damage ● Destroyed and necrotic renal tubules; ● Absent coccygeal vertebrae; ● Absence of hind limbs; ● Irregular ribs.
El-Sakhawy et al. (2019)	To evaluate the histological and immunohistochemical evaluation of tartrazine in the cerebellum, submandibular glands and kidneys in rats.	Adult male albino rats received doses of 7.5; 15 and 100 mg/kg/pc/ day.	● Kidneys with interstitial hemorrhage and dilation of the glomerular capillaries; ● Collecting tubules in the medulla with flattened epithelial cells; ● The severities increased with increasing doses.
Albasher et al. (2020)	To evaluate perinatal exposure of the dye in doses within the IDA range in mice, with an emphasis on neuro behavioral changes and redox imbalance.	Pregnant female mice received tartrazine; after birth, at 21 and 35 days, the mice were sacrificed and histological analyzes were performed.	● Lipid peroxidation and decreased antioxidants in different regions of the newborn's brain; ● Increased hemoglobin, erythrocytes, leukocytes and platelets; ● Altered locomotor behavior as a reflex of anxiety; ● Oxidative stress.

1.8. Ecotoxicological Analyses

In the bibliographic survey we found researches with the fish *D. rerio* exposed in different phases to different concentrations of the tartrazine yellow dye. Joshi and Pancharatna (2017) found a value of the Unobserved Effect Concentration (CENO) and Lethal Concentration (CL (I) 50, 96h) of 5 mM (2.67 gL⁻¹) and 29.4 mM, respectively (15.7 gL⁻¹); Jiang et al., (2020) found the CL (I) 50, 96h value of 47.10 mM (25.1 g.L⁻¹). Of these researches, those of Gupta et al., (2019) and Silva and Fracácio (in press), described deformities that were found in the embryonic and larval development of *D. rerio*, suggesting that the tartrazine dye, once released into the aquatic environment, compromises aquatic life (Table 2).

Table 2. Ecotoxicological researches carried out in the last ten years with the yellow dye tartrazine that resulted in toxicity.

Author (s)	Objectives	Concentrations	Conclusions
Joshi and Pancharatna (2017)	To evaluate embryological development of <i>Danio rerio</i> , exposed to the tartrazine dye.	Concentrations of 0.1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 mM (0.053; 0.53; 1.06; 1.60; 2.13; 2.67; 5.34; 10.68; 16.03; 21.37; 26.71; 40.07 and 53.43 g.L ⁻¹) in the gastrulation stage (5.25 hours after fertilization (hpf). Observation until the seventh day. SCENE = 5 mM (2.67g.L ⁻¹) CL (I) 50, 96h = 29.4 mM (15.7 g.L ⁻¹)	• 20 to 30 mM caused tail flexion, and edema of the cardiac sac in 50% of the larvae; • At 30 to 50 mM, heartbeat declined along with tail flexion deformities, edema of the cardiac sac, causing mortality within 96 to 144 hpf; • Development has completely stopped at 75 to 100 mM concentration.

Linskens (2018)	To evaluate learning, cognitive flexibility, and the memory of adults of <i>D. rerio</i> , exposed to the dye in labyrinth tests, with different exposure times.	Concentration of 22 μM (11.75 g.L^{-1}) of the dye throughout its life stage (eggs to adulthood) and <i>D. rerio</i> eggs subjected to the dye and removed from the dye after 24 hours after fertilization.	• Lack of understanding and cognitive flexibility; • Exposed for 24 hpf, problems in completing the memory tasks; • constant exposure to dye will affect the ability to learn, remember and reduce the body's cognitive flexibility, even if only exposed to an embryonic level.
Gupta et al. (2019)	To compare oxidative stress in embryonic phases of <i>D. rerio</i>	96 hpf embryos exposed to 0.1% tartrazian in 100 μL with the superoxide desmutase enzyme (SOD).	• Accelerated the hatch rate; • During the initial development it induces the expression of superoxide dismutase 1, inducing oxidative stress pathways; • The embryo's sensitivity to exposure resulted in significant mortality in a concentration-dependent manner, especially at higher concentrations.
Jiang et. al. (2019)	Evaluation of <i>D. rerio</i> embriolarval toxicity when exposed tartrazine dye	<i>D. rerio</i> subjected to a concentration of 5 to 50 mM. (2.67 g.L^{-1} to 26.71 g.L^{-1}) LC50 = 47.10 mM (25.16 g.L^{-1})	• Difficulty in hatching and developmental abnormalities, such as cardiac edema, decreased heart rate, yolk sac and spinal edema; • Scoliosis and tail distortion.
Silva and Fracácio (2020)	Evaluation of toxicity in embryos and larvae of <i>D. rerio</i> when exposed tartrazine dye	<i>D. rerio</i> subjected to concentrations of 0.05 g.L^{-1} in two dye patterns (Commercial and Pure) and in concentration of 0.5 g.L^{-1} of pure standard	• Coagulation in the embryos; • Deformities in the larvae such as edema (cardiac and yolk sac); • Scoliosis and tail distortion

1.9. Discussion

According to the literature, the yellow dye tartrazine can cause toxicity to the humans in dosages considered safe, in periods of prolonged exposure. It was also observed that dosages below that recommended for IDA, demonstrated the ability to damage liver and kidney tissues in fetuses, in addition to other changes described above (table 1), depending on the time of exposure.

The reduction of dye into aromatic amines and benzene compounds in the digestive system of rats can trigger anemia, pathological lesions in the brain, liver, kidney and spleen, in addition to allergic reactions, tumor and cancer. Changes in serum albumin cause decreased production and malabsorption of proteins, cirrhosis and increased liver enzymes, which compromises cells and the work of mitochondria, leading to an imbalance of oxidative stress and the presence of free radicals that cause cytogenicity. The dye was able to interact with DNA, triggering mutations.

Ingestion of the dye also worsens symptoms in patients with allergic reactions, bronchial asthma, hives and behavioral changes such as attention deficit and hyperactivity in children. Tartrazine also induced adverse effects on memory, learning and behavioral changes in rats and fish.

Research with *D. rerio* has shown that the additive alters physiological functions, not only by ingestion, but at constant exposures, as is the case in aquatic environments. Regarding the ecotoxicity of the tartrazine yellow dye, data from Joshi and Pancharatna (2017) indicated a CENO value of 5mM, equivalent to a concentration of 2.67g / L-1, in 7-day tests with *D. rerio* embryos. However, it is worth mentioning that the eggs of this species present the chorion, an acellular membrane that surrounds the embryo until the moment of its hatching, which occurs at 72 hpf (hours after fertilization). This structure has pores between 0.5 and 0.7 mm in diameter and, in this way, partially isolates the embryo from the environment (Medeiros et. Al., 2017). Therefore, for this value to be considered safe, other stages of the species' development must be tested. The literature also reports that the chorion can be impervious to a good number of pollutants, however, studies have proven that the tartrazine yellow dye has overcome this protective barrier (Joshi and Pancharatna, 2017; Gupta et al., 2019; Silva and Fracácio, 2020), and the dye also accelerated the embryo hatch rates (from 72 hpf to 48 hpf).

In the absence of CENO, the literature recommends using the lethal concentration value to 50% of the exposed population, at a given exposure time, and dividing it by 10, as estimated safety values. Thus, the estimated CENO values would be 2.94 mM and 4.71 mM, corresponding to 1.57 g.L⁻¹ and 2.51g.L⁻¹ respectively, close to the reported CENO values. However, data obtained by Silva and Fracácio (2020), show that in low concentrations, compared to the values reported above, there was toxicity to larvae in 48 hours after hatching at a concentration of 0.05 g.L⁻¹.

The concern with the protection of aquatic life, lies in the fact that the dye can reach surface waters through large-scale production, with an interaction between the consumption of these industrialized foods and the quality of aquatic ecosystems (a challenge for the coming years (Teixeira and Porto, 2008). Conventional effluent treatment systems cannot effectively degrade this type of dye due to its high stability, resistance to light and moderate oxidizing agents. Many companies, due to the peculiar characteristics of their products, dilute the dyes to cause less color impact on the environment.

The use of the dye should be limited to the smallest amount as possible to achieve the desired effect and use them when there is no other alternative, considering the lack of adequate legislation and the impacts they cause environmental and human health.

1.10. Conclusions

- Tartrazine yellow food dye is toxic even at the dose indicated for acceptable daily intake for humans. In this sense, the laws that regulate the use of the additive in food should consider the new research on the molecular interactions of the dye with animal cells to review the doses considered safe;
- There is a direct relationship between the production and use of these dyes and aquatic ecotoxicity, through the release of effluents generated in bodies of water. Without adequate treatments, these chemical compounds and their by-products cause risks to biota;
- The tartrazine yellow dye crosses the protective barrier of the chorion in *D. rerio* embryos and accelerates reproduction. However, studies with other stages of the life cycle of the referred species and with other species of different trophic levels are recommended;
- The regulation 333/2012 of the state of São Paulo should serve as a model for other areas of the national territory and greater attention should be given to the launch of food dyes, since the azocores are freely purchased and used commercially in the food industry. This economic sector is still in need of effective regulation and implies in environmental damage and risks to human health.

Referências

- Abd-Elhakim Y. M., Moustafa G. G., Hashem M. M., H., Ali H. A., Abo-El-Sooud K and El-Metwally A.E., (2019) "Influence of the long-term exposure to tartrazine and chlorophyll on the fibrogenic signalling pathway in liver and kidney of rats: the expression patterns of collagen 1- α , TGF β -1, fibronectin, and caspase-3 genes.", *Environmental science and pollution research international*, vol. 26, issue 12, pp. 12368–12378.
- ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes. www.abir.org.br Acesso 13/07/2020.
- Abo-El-Sooud K. A., Hashem M. M., Badr Y. A., Eleiwa M. M. E., Gab-Allaha A. Q., Abd-Elhakim Y. M., Bahy-El-Dien A., (2018) Assessment of hepato-renal damage and genotoxicity induced by long-term exposure to five permitted food additives in rats. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 26341–26350.
- Aboel-Zahab H., El-Khyat Z., Sidhom G., Awadallah R., Abdel-al W., Mahdy K., (1997). Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Boll Chim Farm.* 136:615–27. 261.
- Albasher, G., Maashi, N., Alfarraj, S. Almeer, R., Albrahim, T., Alotibi, F., Bin-Jumah, M., Mahmoud, A. M., (2020). Perinatal Exposure to Tartrazine Triggers Oxidative Stress and Neurobehavioral Alterations in Mice Offspring. *Antioxidants*, 9 (53) doi:10.3390/antiox9010053.
- Almeida, E., Assalin, M. R., Rosa, M. A., Durán, N., (2004). Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quím. Nova* Vol 27 nº5. São Paulo. Sept/Out. 2004 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500023>.
- Al-Shabib N. A., Khan J. M., Khan M. S., Ali M. S., Al-Senaidy A.M., Mohammad A. A. Alsenaidy, Husain F. M., Hamad A. Al-Lohedan H. M. (2017). Synthetic food additive dye “Tartrazine” triggers amorphous aggregation in cationic myoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules* 98 (2017) 277–286.
- Amin K. A., Hameid II A., Elsttar A. H. A., (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.48, n.10, p. 2994–2999.
- Anastácio L. B., Oliveira D. A., Delmaschio C. R., Antunes L. M. G., Chequer, F. M. D., (2016) Corantes Alimentícios Amaranto, Eritrosina B e Tartrazina, e seus possíveis Efeitos Maléficos à Saúde Humana. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences – JAPHAC*, 2015; 2(3): 16-30.
- Anisyah A., Andarwulan N., Hariyadi P. (2011). Tartrazine exposure assessment by using food frequency method in North Jakarta, Indonesia. *Food Nutr Sci.* 2:458–63.
- Anunciação, S.A., Rocha, G.H.A.M., Silva, G.O., Martins, B.M., Borges, E.C.L., Sá, F.P. (2015). Estudo da remoção do corante alimentício, vermelho 40, utilizando cacos de telhas, em função do ph. 8º Encontro Nacional de Tecnologia Química. Realizado em Vitória/ES, de 09 a 11 de Set. 2015.

AWWA. Standards Methods for Water Analysis. 21th edition, APHA, 2005.

Axon A., May F. E. B., Gaughan L. E., Williams F. M., Peter G., Blain P. G., Matthew C., Wright M. C. (2012) Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. *Toxicology* 298 (40– 51).

Basu, A. & Kuma, G.S. (2016a) Studies on the interaction of the food colorant tartrazine with double stranded deoxyribonucleic acid, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34:5, 935-942, DOI: 10.1080/07391102.2015.1057766

Basu, A. & Kuma, G.S. (2016b). Multispectroscopic and calorimetric studies on the binding of the food colorant tartrazine with human hemoglobin. *Journal of Hazardous Materials* 318,468–476.

Bateman B., Warner J.O., Hutchinson E., Dean T., Rowlandson P., Gant C., Grundy J., Fitzgerald C & Stevenson J. (2004). The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of Disease in Childhood*, Londres, v. 89, p. 506-511.

Beltrame, L. T. C. (2006). Sistemas Microemulsionados Aplicados à Remoção de Cor de efluentes têxteis. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

Bhatt D., Vyas K., Singh S., John J, Soni I. (2018) Tartrazine induced neurobiochemical alterations in rat brain sub-regions. *Food Chem Toxicol.* Mar1(13):322-327.

Borzelleca J. F., Hallagan J.B. (1988a). A chronic toxicity/carcinogenicity study of FD&C Yellow No. 5 (tartrazine) in mice. *Food Chem Toxicol.* 26:189–94.

Borzelleca J.F., Hallagan J.B. (1988b). Chronic toxicity/carcinogenicity studies of FD&C Yellow No. 5 (tartrazine) in rats. *Food Chem Toxicol.* 26:179–87.

Brandli, E., Pandolfo, A., Guimarães, J., González, M., & Reinehr, R. (2009). A identificação dos resíduos em uma indústria de alimentos e sua política ambiental. *Revista Brasileira De Ciências Ambientais*(13),45-51.

BRASIL Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa). Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia no Brasil. RDC nº 285/2019 de 22 de maio de 2019. Disponível em: Disponível:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/content>> Acesso 5 fev. 2020.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº. 11, de 26 de janeiro de 2006. Disponível:<[Disponível: http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/content](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/content)> Acesso 5 fev. 2020.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.782, de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1999.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.382 e n.388 de 5 de agosto de 1999. Disponível:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/content>> Acesso 5 fev. 2020.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 04/88 do Conselho Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. 24 de novembro de 1988. Conselho Nacional de Saúde, Decreto n.º 93.933, de 14/01/87, artigos 24 e 66 do Decreto-Lei n.º 986, de 21 de outubro de 1969, e no decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1965, Diário Oficial da União, Brasília, DF

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 37 de 1977.
Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/content>> Acesso 5 fev. 2020.

Ceyhan B.M., Gultekin F., Doguc D.K., Kulac E. (2013). Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning and memory in rats. *Food Chem Toxicol* 56:145-

Chao M., Ma X. (2015) Convenient electrochemical determination of sunset yellow and tartrazine in food samples using a poly(L-Phenylalanine)-modified glassy carbon electrode. *Food Analytical Methods*, v.8, p.130-8, 2015.

Chen, X., Qin, P., Zheng, X., Hu, Z., Zong, W., Zhang, D., Yang, B. (2019). Characterizing the noncovalent binding behavior of tartrazine to lysozyme: A combined spectroscopic and computational analysis. *J Biochem Mol Toxicol*.33:e22258. <https://doi.org/10.1002/jbt.22258>.

CNNPA/MS - COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTO
Resolução nº 37/77 Considera laca o sal preparado a partir do corante em combinação com o radical básico de alumínio ou cálcio. Decreto nº 55871/65, Diário Oficial da União. Poder Executivo, de 27 de dezembro de 1977.

CODEX ALIMENTARIUS (2015) General Standard For Food Additives, Codex Stan 192-1995.2015. Food and Agriculture Organization of The United States and World Health Organization.

Collins T. F., Black T. N., Brown L. H., Bulhack P. (1990) Study of the teratogenic potential of FD&C Yellow No. 5 when given by gavage to rats. *Food Chem Toxicol* 28:821–7.

Collins T.F., Black T. N., O'Donnell M. W. Jr, Bulhack P. (1992). Study of the teratogenic potential of FD&C yellow No. 5 when given in drinking-water. *Food Chem Toxicol*.30: 263–268.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providencias. Brasil. 27 p. 2005.

Connolly A., Hearty A., Nugent A., McKevitt A., Boylan E., Flynn, A. et al. (2010). Pattern of intake of food additives associated with hyperactivity in Irish children and teenagers. *Food Addit Contam Part A*.

Corder E.H., Buckley E. (1995). Aspirin, salicylate sulphite and tartrazine induced bronchoconstriction, safe doses and case definition in epidemiological studies. *J Clin Epidemiol*. 48:1269–75.

Cosmoquímica Indústria & Comércio Ltda. Ficha de informações de segurança de produto químico – corante amarelo tartrazina. Informe técnico. São Paulo(2009)5p. Disponível em: <http://cosmoquimica2.tempsite>. Acesso em: 04/marc/2020.

Davis V. M., Bailey J. E. Jr (1993) Chemical reduction of FD&C Yellow No. 5 to determine combined benzidine. *Journal of Chromatography*, v.635, p.160-164.

Del Giovine L., Bocca A. P. (2003) Determination of synthetic dyes in ice cream by capillary electrophoresis. *Food Control*, v.14, p.131-135.

Demirkol O., Xinsheng Zhang, X., Ercal N. (2012) Oxidative effects of Tartrazine (CAS No. 1934-21-0) and New Coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells. *J. Verbr. Lebensm* 7:229–236.

DIRETIVA 95/45/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 26 de Julho de 1995. *Diário Oficial das Comunidades Européias*, p.1, L 226 de 22 de setembro de 1995.

Dixit S., Purshottam S. K., Khanna S. K., Das M (2011). Usage pattern of synthetic food colours in different states of India and exposure assessment through commodities preferentially consumed by children.

Doell D., Folmer D., Lee H., Butts K., Carberry S. (2015). Exposure estimate for FD&C colours for the US population. United States Food and Drug Administration, Washington, USA, at the 250th National Meeting of the American Chemical Society, August 16–20, 2015, Boston, MA, USA.

Doguc D. K., Ceyhan B. M., Ozturk M., Gultekin F. (2013) Effects of maternally exposed colouring food additives on cognitive performance in rats. *Toxicology and Industrial Health*. 29(7):616-623.

EFSA (2008). Assessment of the results of the study by McCann et al. (2007) on the effect of some colours and sodium benzoate on children's behaviour. EFSA Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids, and Food Contact Materials. *EFSA J*. 660:1–54.

EFSA (2009). Scientific opinion on the re-evaluation of tartrazine (E 102). Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. *EFSA J*. 7:1331–83.

Elhkim M. O., Heraud F., Bemrah N., Gauchard F., Lorino T., Lambre C. (2007). New considerations regarding the risk assessment on tartrazine. An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regul Toxicol Pharmacol*. 47, 308–16.

El-Sakhawy, M. A., Mohamed, D. W., Ahmed, Y. H. (2019). Histological and immunohistochemical evaluation of the effect of tartrazine on the cerebellum, submandibular glands, and kidneys of adult male albino rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. Apr;26(10):9574-9584. doi: 10.1007/s11356-019-04399-5. Epub 2019 Feb 6.

El-Wahab H. M., Moram G. S. (2013). Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavour additives on male rats. *Toxicol Ind Health*. 29:224–32.

Erickson Z.T., Falkenberg E.A., Metz G.A. (2014). Lifespan psychomotor behavior profiles of multigenerational prenatal stress and artificial food dye effects in rats. *PLoS One*. 9:e92132.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES.

Chemical risks and JECFA (2015) Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>>. Acesso em: 7 março. 2020.

Fávero D. M., Ribeiro C. S. G., Aquino A. D. (2011) Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios a população. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 18, n. 1, p. 11-20.

FDA US FOOD & DRUG ADMINISTRATION - CRF- Code of Federal Regulations Title 21.vol 1 April 1. 74.705 FD & C Yellow No. 5. (2019) www.ata.fda.gov (acesso Mar 2020).

Floriano J. M., Da Rosa E, Amaral Q. D F., (2018) Is tartrazine really safe? In silico and ex vivo toxicological studies in human leukocytes: a question of dose. *Toxicol Res (Camb)*. Jul 20;7(6):1128-1134.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA FD&C Yellow No.5 (1985) Final rule, removal of stay. *Federal Register*, v.50, p. 35774-35783.

Freitas A. S., (2012) Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Tecnológica*, Vol. 7, N° 2, 65 – 72.

FSANZ (2012). Supplementary report to the 2008 Survey of added colours in foods available in Australia. Canberra: Food Standards Australia New Zealand.

Gan, T.; Sun, J.; Meng, W.; Song G, L.; Zhang, Y. (2013).Electrochemical sensor based on graphene and mesoporous TiO₂ for the simultaneous determination of trace colourants in food. *Food Chemistry*, v.141, p.3731-7, 2013.

Gao Y, Li C., Shen J, Yin H., An X., Jin H. (2011) Effect of Food Azo Dye Tartrazine on Learning and Memory Functions in Mice and Rats, and the Possible Mechanisms Involved *Journal of Food Science*. Vol. 76, No. 6.

Ghonimi W.A., Elbaz A. (2015). Histological changes of selected Westar rat tissues following the ingestion of tartrazine with special emphasis on the protective effect of royal jelly and cod liver oil. *J Cytol Histol*. 6:346.

Giri A K., Das S. K., Talukder G., Sharma A. (1990). Sister chromatid exchange and chromosome aberrations induced by curcumin and tartrazine on mammalian cells in vivo. *Cytobios*. 62:111–7.

Gomes, K.M.S.; Oliveira, M.V.G.A; Carvalho, F.R.S.; Menezes, C.C.; Peron, A. P. (2013) Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-110), Bordeaux Red (E-123), and Tartrazine Yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Science Technology*, v.33, n.1, p. 218-223.

Gupta, R.; Ranjan, S.; Yadav, A; Verma, B.;¹ Malhotra, K.; Madan, M.; Ojasvi Chopra, O.;Jain, S.; Gupta, S.; Joshi, A.; Bhasin, C.; Mudgal, P. (2019) Toxic Effects of Food Colorants Erythrosine and Tartrazine on Zebrafish Embryo Development. *Current Research in Nutrition and Food Science*. Vol. 07, No. (3): Pg. 876-885.

Ha M. S., Ha S D., Choi S. H., Bae D. H. (2013). Exposure assessment of synthetic colours approved in Korea. *Food Addit Contam*. 30:643–53.

Hernández-Zamora, M. & Martínez-Jerónimo, F. (2019), Exposição ao corante azo O azul direto 15 produz efeitos tóxicos em microalgas, cladoceros e embriões de peixe-zebra. *Ecotoxicology* 28, 890-902. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02087-1>

Himri I., Bellahcen S., Souna F., Belmekki F., Aziz M., Bnouham M., Zoheir J., Berkia Z., Mekhfi H., Saalaoui E., (2011). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. A 90-day oral toxicity study of tartrazine, a synthetic food dye, in wistar rats. 3(3):159–169.

Horvat A. J. M., Petrovic, M.; Babic S., Pavlovic, D. M., Asperger D., Pelko, S., Mance A. D., Kastelan-Macan M. (2012). Analysis, occurrence and fate anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 31, p. 61-24.

Hunger, K. (2003) Industrial dyes: chemistry, properties, applications. Weinheim: Wiley-VCH Publishers, 2003.

IACM (2015). Safety evaluation of the food colour additive tartrazine (INS 102). Submitted to WHO by the International Association of Color Manufacturers, Washington, DC, USA.

Jiang et al (2020). Toxicity Assessment of 4 Azo Dyes in Zebrafish Embryos. *International Journal of Toxicology*, 2020; Vol. 39(2) 115-123.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES – JECFA (2012) Laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) n° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. COMMISSION REGULATION (EU) No 231/2012 of 9 March 2012. Official Journal of the European Union, L 83/1, 22.3.

Joshi V. & Pancharatna K. (2017), Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. *International Journal of Toxicology* 37(1): 38-44. 2017.

Kamel M. M., Heba S., El-Lethey H. (2011). The Potential Health Hazard of Tartrazine and Levels of Hyperactivity, Anxiety-Like Symptoms, Depression and Anti-social behaviour in Rats. *Journal of American Science*, 7(6).

Kashanian S & Zeidali S. H. (2011) Binding Studies of Tartrazine Food Additive. *DNA and Cell Biology*, 30(7):499-505.

Khayyat L., Essawy A., Sorour J., Soffar A. (2017) Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects *in vivo*. *Peer J* 5:3041-3055.

Lei Y., Zhang S., Fang L., Akash M. S. H., Shi W., Sun K., Xu Y. and Chen S., A sensitive and specific enzyme immunoassay for detecting tartrazine in human urinary samples. Article in *Analytical methods* January 2013 DOI: 10.1039/c2ay26121a

Linskens A. (2018) The Long Term Effects of Tartrazine (FD&C Yellow No. 5) on Learning, Cognitive Flexibility, and Memory of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos into Adulthood, 2018. Disponível em people.uwm.edu (acesso 7/3/2020).

Lok K.Y., Chung W.Y., Benzie I., Woo J. (2010). Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 3:148–55.

Maekawa A., Matsuoka C., Onodera H., Tanigawa H., Furuta K., Kanno J. (1987). Lack of carcinogenicity of tartrazine (FD&C Yellow No. 5) in the F344 rat. *Food Chem Toxicol.* 25:891–6.

Mathur N., Bhatnagar P., Sharma P. (2012). Review of the Mutagenicity of textile Dye Products. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, v.2, p.1-18, 20.

Matsuo H., Yokooji T., Morita H., Ooi M., Urata K., Ishii K., Takahagi S., Yanase Y., Hiragun T., Mihara S., Hide M. (2013). Aspirin Augments IgE-Mediated Histamine Release from Human Peripheral Basophils via Syk Kinase Activation. *Allergology International*, 62:503-511.

Matsuzaki M., Mucci, J. L. N. & e Rocha A. A., (2004). Comunidade fitoplanctônica de um pesqueiro na cidade de São Paulo. *Rev. Saúde Pública*, 38(5):679-86.

Mc Cann D., Barrett A., Cooper A., Cumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga-Barke E, Warner, J O, Stevenson, J (2007) Food additives and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*.370:1560-1567.

Medeiros, A.M.Z., Silva, G. H., Castro V.L.S.S., Monteiro, R.T.R., Martinez, D.S.T.(2017). Nanoecotoxicidade do óxido de grafeno: influência do córion dos embriões de zebrafish (*Danio rerio*) e coexposição com ácido húmico. Workshop de nanotecnologia aplicada ao agronegócios. Anais, São Carlos Empraba Instrumentação, 9:675-678p.

Mohamed A. A., Galal A. A., Elewa Y. H., (2015). Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. *Acta Histochemica*. 117:649–58.

Morais L. S. T., (2010) Avaliação clínico – laboratorial do uso da tartrazina em pacientes atópicos: amostra ampliada. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências médicas da universidade federal fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de mestre. Área de concentração: ciências médicas 82p.

Morrison R. T., Boyd R, N., (2005). Química Orgânica. Trad. M. Alves da Silva. Fundação Calouste Gulbenkian, v.14.

Moutinho I. L. D. A., Bertges L. C. B. & Assis R. V.C., (2007) Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow nº5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Braz. J. Biol.*, 67(1): 141-145.

Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T. (2010). Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48:2934-2944.

Nascimento, L., & Naval, L. (2019) Toxicidade determinada pelo uso dos agrotóxicos em organismos indicadores de qualidade da água. *Revista Brasileira De Ciências Ambientais* (Online), (53), 69-80. <https://doi.org/10.5327/Z2176-947820190466>.

Pan X., Qin P., Liu R., Wang J. (2011) Characterizing the Interaction between Tartrazine and Two Serum Albumins by a Hybrid Spectroscopic Approach.

Patterson R. M., Butler J.S., (1982). Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Food Chem Toxicol.* 20:461–5.

Pollock I., Warner J.O. (1990). Effect of artificial food colours on childhood behaviour. *Arch Dis Child.* 65:74–7.

Polônio M. L. T. & Peres F. (2009). Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira *Cad. Saúde Pública* vol.25 no.8 Rio de Janeiro.

Prado M. A. e Godoy H. T. (2003). Corantes artificiais em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.14, n.2, p.237-50. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer>.

Prival M. J., Davis V. M., Peiperl M. D., Sandra J., Bell S. J. (1988) Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, v. 206, p. 247-259.

Prival M. J., Mitchell V. M. (1982). Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of Flavin mononucleotide and hamster liver S9. *Mutat Res.* 97:103–116.

Prival M. J., Peiperl M. D., Bell S. J. (1993). Determination of combined benzidine in fd & c yellow no. 5 (tartrazine), using a highly sensitive analytical method. *Fd Chem. Toxic.* V 31, No. 10:751-758.

Resende M. R. (2015) Mutagenicidade do corante alimentício tartrazina no ensaio *salmonella*/microsoma. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Tecnologia. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Tecnologia.118p.

Safety evaluation of certain food additives: prepared by the Eighty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva: World Health Organization; 2017 (WHO Food Additives Series, No. 73).

Santos E., Bressan, K., (2011). Projeto da indústria de alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de engenharia química e engenharia de alimentos. 61p.

Sasaki Y. F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K., Tsuda S. (2002) The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, v. 519, p. 103-119.

Saxena B, Sharma S. (2014). Serological changes induced by blend of sunset yellow, metanil yellow, and tartrazine in Swiss albino rats *Rattus norvegicus*. *Toxicol Int.* 21:65–8.

Saxena B., Sharma S., (2015). Food colour induced hepatotoxicity in Swiss albino rats *Rattus norvegicus*. *Toxicol Int.* 22:152–7.

Shore, J. Colorants and auxiliaries: organic chemistry and application properties. V. 1. 2.ed. Bradford: Society of Dyers and Colorists, 2002.

Silva, J & Fracácio, R. (2020). Toxicity of yellow tartrazine dye on *Danio rerio* larvae after a multi-generation exposure (no prelo).

Soares, B. M. S., Araújo, T. M. T., Ramos J. A. B., Pinto L. C., Khayat B. M., Bahia M. O., Montenegro, R. C., Burbano, R. M. R., Khayat A. S. (2015). Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer Research*,35.

Sousa, S. P. (2016). Degradação do corante tartrazina por fotocatalise. Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Goiás. Trabalho de Conclusão de Curso. 45p.

Stevenson J, Sonuga-Barke E, McCann D, Grimshaw K, Parker KM, Rose-Zerilli MJ et al. (2010). The role of histamine degradation gene polymorphisms in moderating the effects of food additives on children's ADHD symptoms. *Am J Psychiatry*.167:1108–15.

Suh H.J., Choi S., (2012). Risk assessment of daily intakes of artificial colours additives commonly consumed in Korea. *J Food Nutr*.52:13–22.

Tanaka T., (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol*.44:179–87.

Tanaka T., Takahashi O., Oishi S., Ogata A. (2008). Effects of tartrazine on exploratory behavior in a threegeneration toxicity study in mice. *Reprod Toxicol*.26:156–63.

Teixeira, C. & Porto, R. (2008). Avaliação da qualidade da água e autodepuração dos rios da Bacia do Rio Piracicaba. *Revista Brasileira De Ciências Ambientais (Online)*, (16), 20-31 Recuperado: http://www.rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/427

Vidotti, E. C & Rollemberg, M. C. E., (2006). Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 2, 230-233.

WHO Food Additives Series No. 73, 2017 Safety evaluation of certain food additives Eighty-second JECFA Renner HW (1984). Tartrazine – A reinvestigation by in vivo cytogenetic methods. *Food Chem Toxicol*. 22:327.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2013) List of chemicals in functional class color. The International Programme on Chemical Safety: World Health Organisation.

Ye X.; Du Y.; Lu D. Wang C. (2013). Fabrication of β -cyclodextrin-coated poly (diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene composite film modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for simultaneous electrochemical determination colorants of sunset yellow and tartrazine. *Analytica Chimica Acta*, v.779, p.22-34.

Zanoni & Yamana K. A. (2017) Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento / Org. Maria V. Boldrin Zanoni, Hideko Yamanaka. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica.

Zhang Y., Hu L., Liu X., Liu B., Wu K., (2015) Highly-sensitive and rapid detection of ponceau 4R and tartrazine in drinks using alumina microfibers-based electrochemical sensor. *Food Chemistry* 166:352–357.

Zhao, P.; Hao, J. (2015). 2,6-Diaminopyridine-imprinted polymer and its potency to hair-dye assay using graphene/ionic liquid electrochemical sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v.64, p.277-84.

Zollinger H. (1991). *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. WILEY - VCH, v.3, p. 492.

Capítulo 2: Ecotoxicidade do corante alimentar amarelo tartrazina nos organismos teste *Daphnia similis* (Cladocera) e *Danio rerio* (Cyprinidae): ênfase em multigerações

Resumo

A literatura relata o corante alimentar amarelo tartrazina como cancerígeno, causador de doenças dermatológicas, problemas respiratórios e hiperatividade em crianças. Apesar de seu uso intensivo, o impacto do corante no ambiente ainda não foi esclarecido, portanto, neste trabalho, ensaios de ecotoxicidade em multigerações, seguidas de ensaios de recuperação biológica com o microcrustáceo *Daphnia similis* e com o peixe *Danio rerio*, em concentrações legalmente permitidas do corante em alimentos, foram realizados. Os resultados para *D. similis* nas concentrações de 0,05 g.L⁻¹ e 0,4 g.L⁻¹ da geração parental (F0) excederam significativamente o controle no número de neonatos e, nas concentrações de 0,025 g.L⁻¹ e 0,8 g.L⁻¹ houve efeito crônico. A geração F1 continuamente exposta ao corante, e F1 em recuperação biológica, em relação à geração F0, apresentaram menor capacidade de sobrevivência e capacidade reduzida de gerar descendentes, portanto não houve recuperação biológica. Em *D. rerio*, o número de ovos viáveis da geração F0 na concentração de 0,5 g.L⁻¹ superou o controle em 100% e na concentração de 0,05 g.L⁻¹ em 58%, mas 72 horas após a fertilização, o número de ovos foi compatível com o controle. Houve efeito na sobrevivência e reproduções da geração F1, exposta desde o nascimento até onze meses de idade e não houve recuperação após esse período quando foram removidos do corante e colocado na água de cultivo por três meses. Peixes da geração F1 morreram após quinze meses, mostrando que o corante influenciou sua longevidade.

Palavras-chave: azo corante, recuperação biológica, reprodução, hormese, multigerações, ecotoxicidade.

2.1. Introdução

2.1.1. Características químicas do corante amarelo tartrazina

O corante amarelo tartrazina é preparado a partir da diazotação do ácido 4-amino-benzeno com ácido nítrico de sódio, o composto diazo é acoplado com ácido 4,5-di-hidro-5-oxo-1- (4-sulfofenil) -1H-pirazol-3-carboxílico ou com éster metílico, ou éster etílico, ou um sal de ácido carboxílico, que é isolado e purificado como o sal de sódio ou cálcio (FDA 21 CFR74.705).

Como principais componentes não corados, é possível encontrar cloreto de sódio e/ou sulfato de sódio em sua composição, porém, os teores de corantes totais não devem ser inferiores a 85%. (DIRETIVA 95/45 / CE 1995). O corante é sintetizado a partir da tinta de alcatrão de carvão e possui a nomenclatura IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada; de sal trissódico 5-hidroxi-1- (4sulfonatofenil) -4- (4-sulfonato-fenilazo) -H-pirazol-3-carboxilato, inserido na classe monoazo, fórmula $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$, massa molar 534,35781 g mol⁻¹, registro na base de dados do Chemical Abstracts Service (número CAS) 1934-21-0 / 19140, INS - International Numbering System E102, composição 100%, ponto de decomposição > 150 °C. O produto é estável em condições normais de armazenamento, protegido da luz solar direta, calor e umidade, tem alta solubilidade em meio aquoso e pode ser identificado por espectrofotometria UV-VIS em um comprimento de onda próximo a 426 nm (DIRETIVA 95/45/CE 1995).

Esta característica ocorre devido a presença de cromóforos, grupos carboxílicos, nitro, hidroxi e amino (Del Giovine e Bocca 2003); a solubilidade em água é de 160 a 200g 100 mL⁻¹ a 25 °C, a densidade de 1,45 g / cm³ (Nº Fisqp Dynac006 - Dynatech 2016; Cosmoquímica Ind. e Com. 2009). De acordo com Zollinger (1991), a presença de grupos sulfônicos (-SO₃H) é o que o torna muito solúvel em água, além de dar um caráter ácido ao azo corante.

Corantes azóicos são extremamente solúveis em água, de coloração intensa, se lançados diretamente sem tratamento nos corpos hídricos podem impedir a quantidade de luz que penetra nos corpos d'água e interferir no processo de fotossíntese das algas, tornando-se um perigoso potencial de contaminação. O corante amarelo tartrazina é utilizado em indústrias de diversos segmentos, como papel, couro, têxtil, cosmético, farmacêutico e de alimentos.

2.1.2. Características toxicológicas do corante amarelo tartrazina

Corantes azóicos são extremamente solúveis em água, de coloração intensa, se lançados diretamente sem tratamento nos corpos hídricos podem impedir a quantidade de luz que penetra nos corpos d'água e interferir no processo de fotossíntese das algas, tornando-se um perigoso potencial de contaminação. O corante amarelo tartrazina é utilizado em indústrias de diversos segmentos, como papel, couro, têxtil, cosmético, farmacêutico e de alimentos.

O corante é descrito na literatura como cancerígeno e relacionado a problemas dermatológicos e respiratórios (Prado e Godoy 2003), tais como urticária, broncoespasmo, rinite, angioedema, além de hiperatividade em crianças (Antilo e Bernardino 1995; Polônio e Peres 2009).

De acordo com o Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes (CCFAC), órgão que estabelece os níveis permitidos e atua em conjunto com o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), comitê científico internacional que avalia os riscos associados com o consumo de aditivos alimentares, as concentrações de tartrazina permitidas nos alimentos são 0.05 g.L^{-1} (mínimo) a 0.5 g.L^{-1} (máximo).

Na indústria de alimentos, o corante amarelo tartrazina é um aditivo alimentar amplamente utilizado devido aos vários tons de coloração que pode fornecer aos produtos, não há dados sobre as perdas de corantes nos processos industriais e seu grau de periculosidade é mais direcionado para a toxicidade que representa para a saúde humana e não há pesquisas para descrevê-lo quando lançado no meio ambiente.

Os estudos de toxicidade com o corante, até agora, foram realizados em ratos ou camundongos, com efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos (Amin et al. 2010), neurocomportamentais (Tanaka et al. 2008), genotóxicos para os leucócitos do sangue (Khayat et al. 2017) e declínio das atividades enzimáticas, comprometendo as funções de aprendizagem e memória em ratos (Gao et al. 2011). Estudos enfatizando a reprodução de organismos sob a influência do corante são amplamente discutidos e controversos. Borzelleca e Hallagan (1988) estudaram o efeito do corante adicionado à alimentação de ratos da geração parental, com ingestão média de 2.641 e 3.348 $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}$, durante a exposição máxima de 113 e 114 semanas, e nenhum efeito tóxico ou cancerígeno foi observado.

Collins e Cols (1990), (1992) administraram doses de 60, 100, 200, 400, 600 e 1000 mg.kg⁻¹ do peso corporal em ratas grávidas de 0 a 19 dias de gestação, nenhuma toxicidade materna ou efeitos relacionados à dose impossibilitaram o desenvolvimento fetal. Posteriormente, o corante foi administrado em ratos durante toda a fase gestacional, em doses de 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,7% diluído em água potável e 67,4; 131,8; 292,4; 567,9 e 1.064,3 mg kg⁻¹ peso corporal de tartrazina aos alimentos, e nenhum efeito materno ou de viabilidade, tamanho, peso ou teratogênicos no desenvolvimento fetal foram observados.

Doguc et al. (2012) avaliaram a aprendizagem e o comportamento de ratos nascidos de mães alimentadas com o corante (0,5 mg kg⁻¹ dia⁻¹), durante a gravidez, e observaram pequenas alterações na atividade locomotora, atividade exploratória e níveis de ansiedade na prole, e concluíram que essas alterações podem estar relacionadas a síndrome do transtorno de déficit de atenção (TDAH).

Em *D. rerio*, Linskens (2018), avaliou aprendizagem, flexibilidade cognitiva e a memória de adultos expostos a uma concentração de 22 µM do corante ao longo da vida (ovos até a idade adulta) e embriões submetidos ao corante e removidos do corante 24 horas pós-fertilização (hpf), usando testes de labirinto, com diferentes tempos de exposição. Os *D. rerio* submetidos ao corante por seis meses a um ano apresentaram falta de compreensão, flexibilidade cognitiva e danos de memória. *D. rerio* expostos ao corante por apenas 24 hpf, apresentaram problemas de memória. O autor também concluiu que a exposição em um nível embrionário, sem exposição futura, ainda afetará significativamente o organismo em sua capacidade de lembrar e ter flexibilidade cognitiva.

Joshi e Pancharatna (2017), estudaram embriões de *D. rerio* submetidos ao corante e concluíram que até uma concentração de até 10 mM (5,34 g), o corante não era letal e não induziu qualquer deformidade morfológica; a 20 mM - 30 mM (10,68 g – 16,03 g) causou anormalidades como deformidades e frequências cardíacas alteradas como bradicardia, distorção da cauda e, deformidade da gema e em 50 mM – 100 mM (26,7 g – 53,4 g) o desenvolvimento parou, levando à morte.

Alguns estudos avaliam a reversibilidade ou recuperação biológica de *D. rerio* quanto às alterações de sua capacidade reprodutiva (Van den Belt et al. 2002, Nash et al. 2004, Larsen et al. 2009), porém, não há estudos avaliando a capacidade de recuperação biológica desses organismos quando expostos a corantes, considerando-se a melhoria das condições ambientais.

A falta de dados ecotoxicológicos e a ausência de regulamentações específicas sem o devido rigor, impulsionaram esta pesquisa para esclarecer se o corante amarelo tartrazina, utilizado nas indústrias alimentícias e dentro das concentrações permitidas para alimentos, se lançados sem tratamento prévio, é seguro para o ambiente aquático? 2) A sobrevivência e capacidade reprodutiva de duas diferentes espécies são suficientes para analisar a ecotoxicidade do corante? 3) As gerações F1 do microcrustáceo *D. similis* e do peixe *D. rerio* se recuperam, se retirados da exposição ao corante?

2.2. Desenho experimental

2.2.1. Cultivo, manutenção e testes ecotoxicológicos com *D. similis*

As culturas de *D. similis* foram mantidas com base na ABNT NBR 12713/2016, com os organismos inseridos em béqueres de 1L de capacidade, contendo 600 mL de água de cultivo (água de abastecimento filtrada em carvão ativado e reconstituída sob condições de 44 mg CaCO₃ L⁻¹). Em cada béquer, foram mantidos 50 indivíduos, totalizando quatro repetições.

A alimentação diária consistia na administração de 0,05 mL de organismo⁻¹ de suspensão de algas (*Raphidocelis subcapitata*) na concentração de 3,0 a 3,5 x 10⁷ células mL⁻¹, determinado por contagem em câmara de Neubauer (ABNT NBR 12648/2011). O pH permaneceu ajustado na faixa de 7,6 a 7,8, e a dureza total na faixa de 42 a 44 mg CaCO₃ L⁻¹. Os béqueres com os microcrustáceos foram mantidos em incubadoras com controle de temperatura (26 ± 1°C), luminosidade (600 lux) e fotoperíodo de (12/12 horas claro / escuro).

Os testes foram realizados, adaptando-se à norma ABNT NBR 12713 (2016). Neonatos de *D. similis*, com idades entre 6 e 24 horas, foram expostos, individualmente, em volumes de 20 mL, por sete dias, para concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 g.L⁻¹ do corante amarelo tartrazina (padrão analítico 100% Dynatech) e o grupo de controle foi estabelecido apenas com água de cultivo. Para cada concentração foram feitas dez repetições e três testes foram realizados.

A solução teste foi renovada a cada 48 horas, com os organismos transferidos para uma nova solução com alimento. Após 168 horas, os neonatos da geração F1 foram contados e 120 neonatos (com idade aproximada de doze horas) foram separados; 60 neonatos continuaram sob exposição do corante e 60 neonatos para recuperação biológica, somente em água de cultivo. Os testes foram considerados válidos quando a mortalidade de organismos adultos no controle não excedeu 20% e quando 60% ou mais das fêmeas adultas que sobreviveram no controle produziram pelo menos dezesseis neonatos em 168h (ABNT NBR 12713, 2016).

2.2.2. Teste de ecotoxicidade com *D. rerio*

Adultos de peixes *D. rerio*, com a idade de cinco meses, foram medidos e pesados para preservar a proporção da quantidade de peixes por aquário em 1 g.L⁻¹ de água. Dezoito fêmeas foram separadas e alocadas, em grupos de três, em aquários de 2 L, e trinta e seis machos separados e alocados, em grupos de quatro, também em aquários de 2 litros. Três aquários femininos e cinco aquários masculinos receberam concentrações de 0,5 g.L⁻¹ do corante tartrazina e o mesmo procedimento foi realizado para a concentração de 0,05 g.L⁻¹ do corante; o grupo controle foi montado com nove fêmeas e dezoito machos apenas em água de cultivo. As soluções de teste foram feitas com água de cultivo. A dureza da água e as variáveis de pH foram ajustadas para valores de 44 mg CaCO₃ L⁻¹ e o pH foi mantido entre 7,5 e 8,0 respectivamente; a temperatura ajustada para 26 ± 0,5°C com fotoperíodo de luz de 12h e 12h escuro, buscando seguir as recomendações da OCDE (2012). Os organismos permaneceram em soluções experimentais (sob a influência das concentrações do corante) por vinte e um dias. Durante os testes, eles receberam ração comercial para peixes duas vezes ao dia, da marca Tetramin® com 97% de proteína bruta, uma semana antes de terminar o teste, nauplius de *Artêmias* foram introduzidas como alimento.

No dia do acasalamento, para estudo dos aspectos reprodutivos, os peixes foram colocados em aquários com 7 litros de água, com rede separadora de ovos e aumento de temperatura de 1°C. A proporção de dois machos para cada fêmea foi mantida, respeitando-se também a proporção de 1g de peixe por litro de água (OCDE, 2012).

Para cada concentração, três reproduções foram realizadas e os ovos viáveis resultantes foram destinados à lavagem na solução de lixiviação ($250 \mu\text{L NaClO L}^{-1}$ / $400 \text{ mL H}_2\text{O}$ de cultivo), este procedimento foi realizado a 0 hpf (horas pós-fertilização), 3 hpf e 24 hpf. Após a lixiviação, os ovos viáveis voltaram à exposição do corante, nas mesmas concentrações da geração parental (F0) e esta geração, F1, foi mantida na exposição do corante até a idade adulta, quando foram realizadas três reproduções, em três períodos diferentes de crescimento dos peixes adultos. Após a última reprodução aos onze meses, esses peixes foram colocados em recuperação biológica apenas com água de cultivo. Os tratamentos dos ovos e as análises da geração F2 foi realizada seguindo-se a mesma metodologia da geração F0 e F1 de lixiviação e tratamento dos ovos.

Os peixes da geração F1 morreram após um mês das reproduções e foram contados e àqueles que apresentavam anomalias foram fotografados.

2.3. Análise química do corante tartrazina

A curva de calibração foi traçada usando o comprimento de onda de 427 nm da tartrazina (Nº Fisqp Dynac 006 -Dynatch 2016) na resolução de 0,01 do espectrofotômetro UV-1800, 12:12h fotoperíodo. A concentração de 10 g.L^{-1} foi preparada como solução estoque para o padrão analítico 100% e a partir destas, soluções de 0; 1;5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg L^{-1} foram preparadas para manter uma relação linear entre as variáveis e avaliar a relação entre o grau de pureza da substância e sua degradação e em períodos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h, foram calculados o pH, oxigênio dissolvido e a condutividade.

A determinação dos metais do corante padrão analítico (PA) foi feita por espectrometria de emissão de plasma: método de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) de acordo com o método 3120B (APHA 2012). As amostras foram preparadas de acordo com EPA US 3010A (1992). Seguindo as recomendações dos Métodos Padrão (APHA 2012) as concentrações de nitrogênio total usando o método 4500 A, nitrato usando o método 4110 B e nitrito usando o método 4500 B.

2.4. Análises estatísticas

O número total de neonatos das gerações F0 e F1 de *D. similis* e *D. rerio* para cada amostra e concentração, foram comparados pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, após testes de normalidade Shapiro-Wilk e homogeneidade da variância com teste T. Nas gerações F1, foram utilizados os testes exato de Fisher.

O número total de ovos de *D. rerio* de cada reprodução e cada concentração foram submetidas ao teste paramétrico ANOVA. Para as análises de correlações entre os elementos químicos dos corantes com o número total de neonatos de *D. Similis* e o número total de ovos, embriões e larvas de *D. rerio* foi aplicado o coeficiente de correlação de Spearman. Nestas análises estatísticas, utilizou-se os programas estatísticos BioEstat 5.3 (Ayres 2007) e Toxstat 3.5 (West Inc. & Gulley 1996).

2.5. Resultados

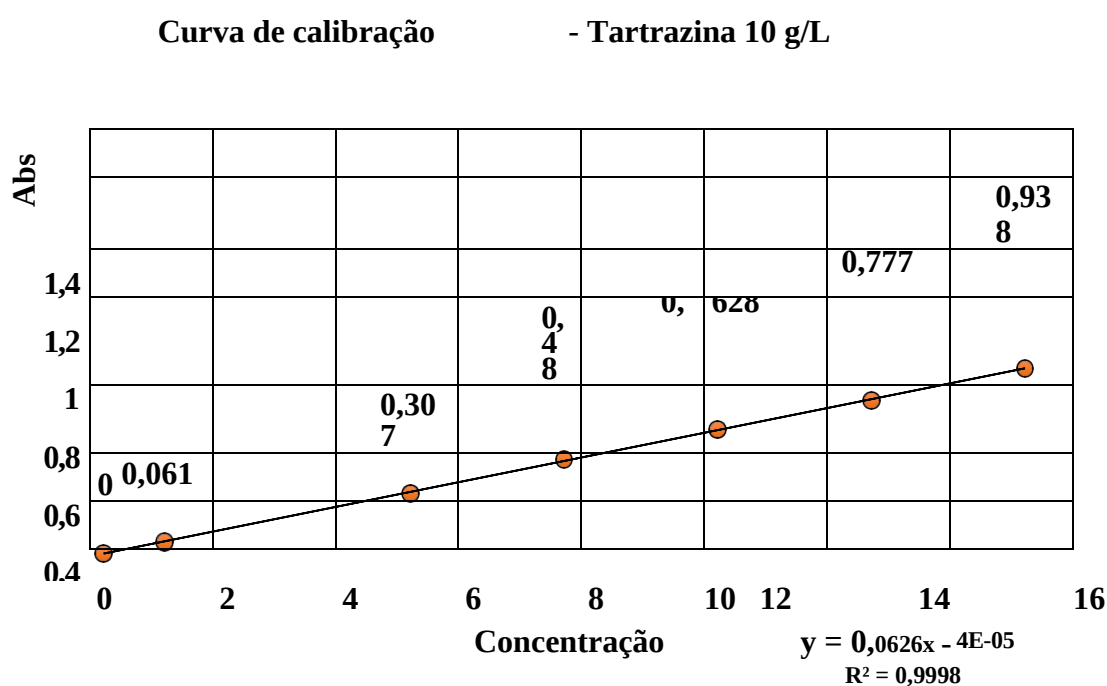
2.5.1. Degradação do corante amarelo tartrazina

O corante não degradou dentro do período de 96h demonstrando estabilidade da molécula a partir das análises de pH do corante (Figura 1). O pH permaneceu dentro da faixa de 7,2 – 7,7, atribuindo caráter básico a solução através da curva de calibração dos corante PA 100% de equação: $y = 0,0626x - 4E-05$ com coeficiente de determinação $R^2=0,09998$. As concentrações, nas três amostras avaliadas variaram de 32,27 a 34,44 mg.L⁻¹

A relação entre pH e degradação do corante tartrazina foi estudada, sendo que o processo de degradação do corante depende primordialmente do pH da solução. Em pH mais ácidos, a degradação é acelerada por um mecanismo de redução do corante e posterior clivagem. (Ostroski et al., 2005). Sendo assim a estabilidade do corante neste caso foi confirmada, não só pela grande estabilidade da molécula (Marmitt et al., 2010; Sleiman et al., 2007), mas também pela continuidade do pH na faixa de 7,0, não resultando em uma solução ácida, o que favoreceu a não degradação do corante.

O oxigênio dissolvido permaneceu maior que $3,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e a condutividade ficou abaixo de 7 mS . A tartrazina possui alta solubilidade em meio aquoso, devido à presença de cromóforos, grupos carboxílicos, nitro, hidroxí e amino que são capazes de aumentar os intensidade de absorção do corante (Del Giovine e Bocca 2003), portanto de difícil descoloração.

Figura 1. Curva de calibração da degradação do corante amarelo tartrazina PA 100%, a partir da concentração de 10 g.L^{-1}

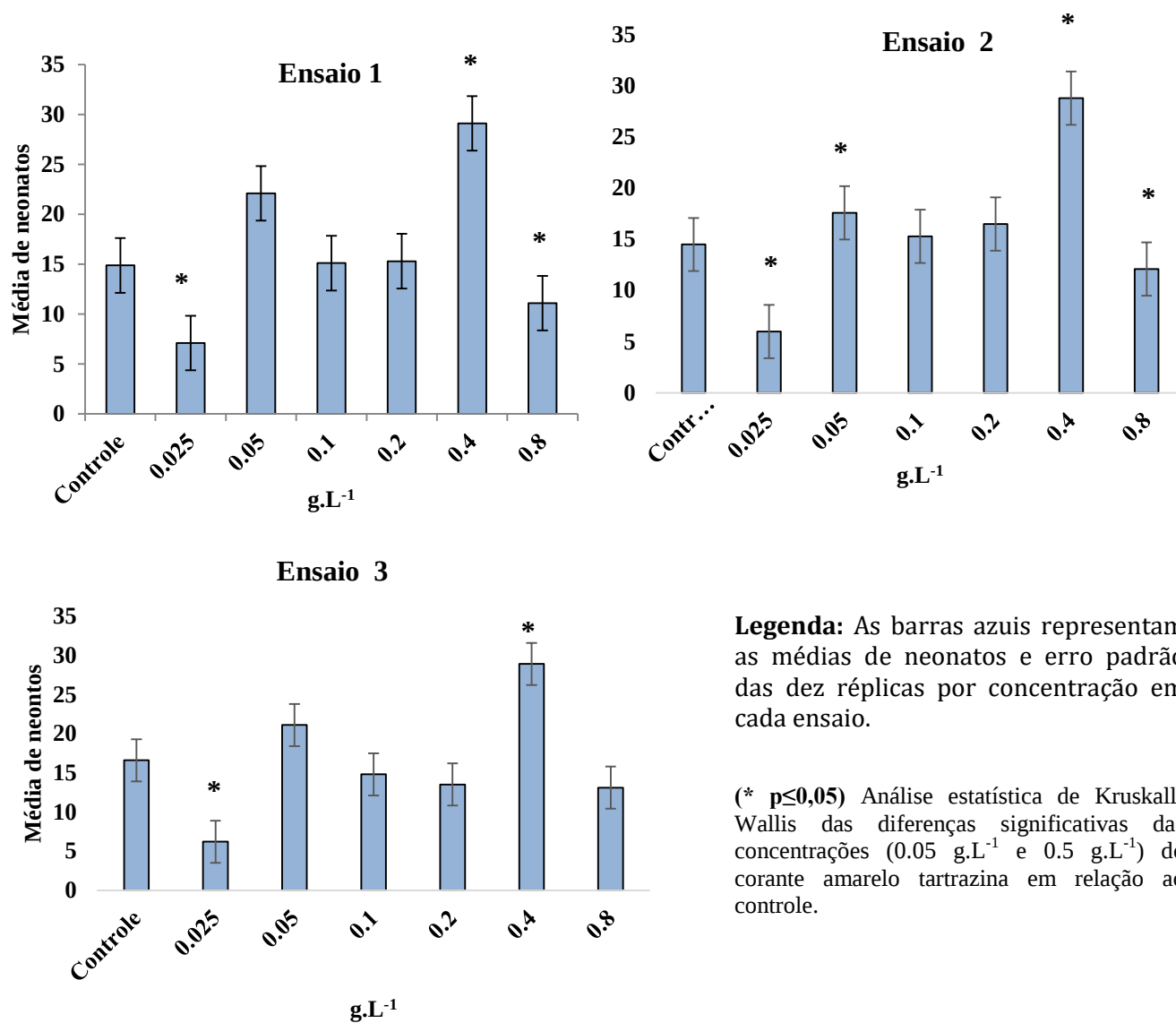


2.6. Testes de ecotoxicidade da espécie *D. similis*

2.6.1. Reprodução da geração F0: *D. similis*

O número de neonatos da geração F0, na concentração de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ foi maior do que o número de neonatos no controle, mas a concentração de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ superou o número de neonatos do controle em 58,62% em todos os ensaios e a concentração de $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ causou toxicidade crônica nos três ensaios (Figura 2).

Figura 2. Resultados da reprodução dos testes de toxicidade da espécie *D. similis* para o corante amarelo tartrazina da geração F0 (* $p \leq 0,05$).

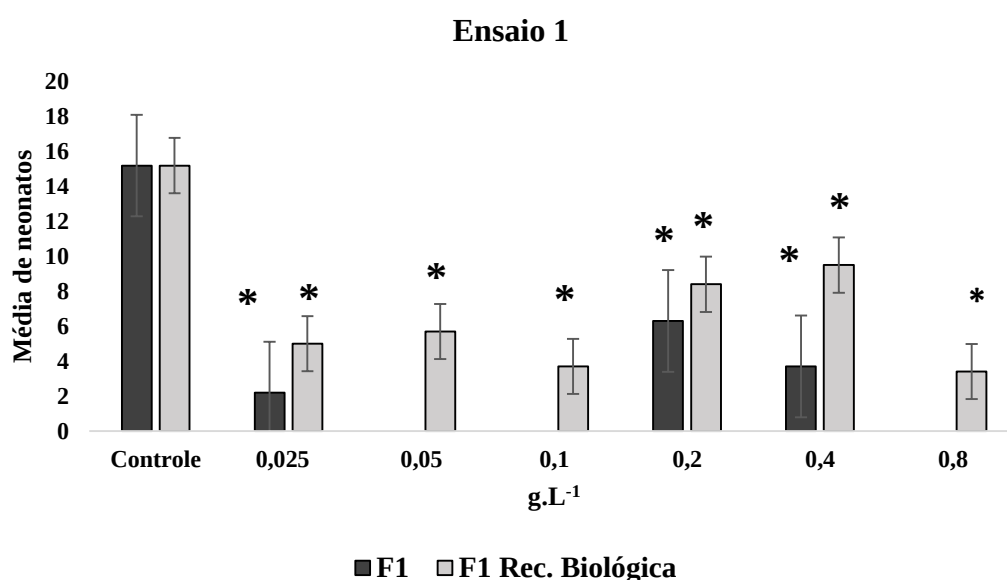


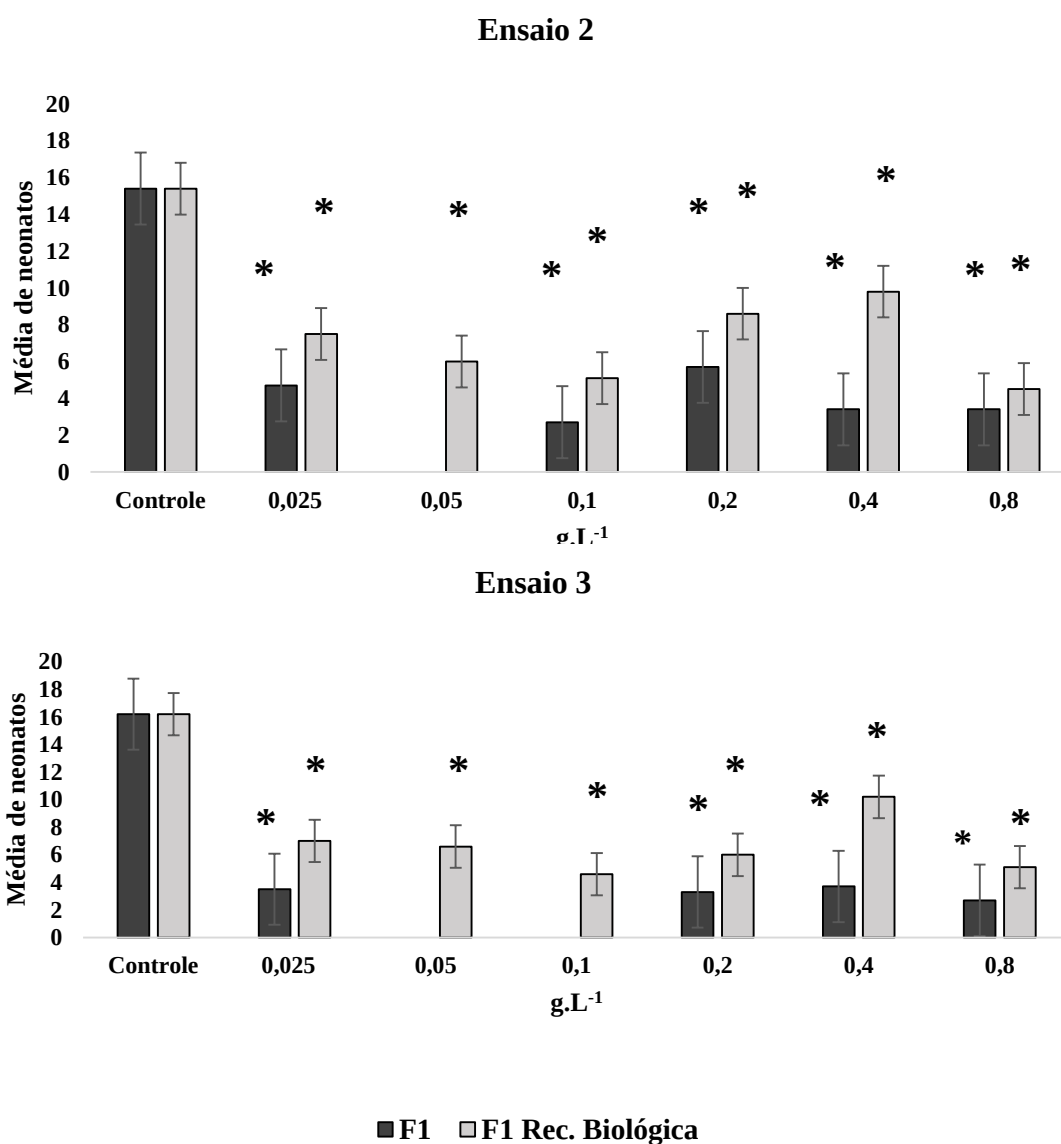
2.6.2. Reprodução da geração F1: *D. similis*

Em todos os ensaios, houve uma diferença significativa entre o controle e as concentrações, considerando o número total de neonatos obtidos em cada condição experimental. Na concentração 0.05 g.L^{-1} não houve reprodução em nenhum ensaio, e na concentração de 0.1 g.L^{-1} não houve neonatos nos ensaios 1 e 3 (Figura 3).

Durante o tempo dos ensaios não houve recuperação dos organismos não expostos, porém, em geral, o número desses neonatos F1 foi maior que o número de neonatos da geração F1 continuamente submetidos às concentrações do corante, principalmente na concentração de 0.4 g.L^{-1} , onde o número médio de neonatos no primeiro ensaio ($9,5 \pm 0,5$) foi 61.6% maior do que o número de neonatos da geração F1, constantemente expostos às concentrações (média $3.7 \pm 0,16$); no segundo ensaio (9.8 ± 0.58) foi 65.3% maior do que a geração F1 exposta ($3.4 \pm 0,18$) e no terceiro teste com um número médio de 10.2 ± 0.47 , 63.7% maior do que o número da geração F1 (3.7 ± 0.14), continuamente exposta (Figura 3).

Figura 3. Comparação do número médio de neonatos dos testes de toxicidade da espécie *D. similis*, tanto da geração F1 continuamente exposta ao corante amarelo tartrazina, quanto da geração de F1 não exposta em comparação ao grupo controle (* $p \leq 0,05$).





Legenda: barras (preta e cinza) representam as médias de neonatos e erro padrão das dez réplicas por concentração em cada ensaio.

(* $p \leq 0,05$) Análise estatística de Kruskal-Wallis das diferenças significativas das concentrações (0.05 g.L⁻¹ e 0.5 g.L⁻¹) do corante amarelo tartrazina em relação ao controle.

2.7. Reprodução de testes de ecotoxicidade da espécie *D. rerio*

2.7.1. Reprodução da geração F0: *D. rerio*

As concentrações mostraram um maior número de ovos viáveis em comparação com o controle, e na maior concentração ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), a média de ovos viáveis ($636,00 \pm 63,36$) superou o controle ($313,67 \pm 11,32$) em 100%, e na concentração de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$, o número médio de ovos ($540,33 \pm 53,90$) superou o controle em 85%.

Após sete dias, o número de larvas sobreviventes nas concentrações foram de 21% na concentração de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ e 15% na concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, e no controle, 39% (Tabela 2).

Houve uma diferença significativa (* $p < 0,05$) entre o número de ovos viáveis no controle e o número de ovos viáveis na concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ apenas na primeira contagem (0 hpf); após 24 hpf, a inviabilidade dos ovos nas concentrações foi próxima à do controle (Tabela 2).

Tabela 1. Médias de ovos e larvas obtidos nas três reproduções da geração (F0), expostos às concentrações de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ do corante amarelo tartrazina e o controle (* $p < 0,05$).

Média do número de ovos e larvas das três reproduções da geração F0			
	Geração F1		
	Controle	$0,05 \text{ g.L}^{-1}$	$0,5 \text{ g.L}^{-1}$
0 hpf	314±11.32	540±53.9*	636±63.36*
24 hpf	296±8.96	430±39.76	487±66.30
48 hpf	276±8.50	344±24.57	373±58.59
72 hpf	259±8.18	282±20.98	302±102.79
Larvas (após sete dias)	122±26.7	112±10.8	98±5.3

± Desvio padrão

hpf = horas pós fertilização

2.7.2. Desenvolvimento da geração F1: *D. rerio*

Os peixes submetidos ao corante amarelo tartrazina, foram observados diariamente durante o desenvolvimento dos peixes até os cinco meses de idade, quando o peso e tamanho atingiram valores próximo ao controle (). Observou-se que na concentração de 0.05 g.L^{-1} (dos 336 peixes, 100 peixes morreram) e na concentração de 0.5 g.L^{-1} (dos 294 peixes, 147 peixes morreram) (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade e deformidades observadas no desenvolvimento da geração F1, nos peixes expostos às concentrações de 0.05 g.L^{-1} e 0.5 g.L^{-1} do corante amarelo tartrazina, do nascimento até os cinco meses de idade.

Mortalidade e deformidades morfológicas observadas no desenvolvimento da geração F1 até os cinco meses de idade no corante amarelo tartrazina				
	Controle	0.05 g.L^{-1}	0.5 g.L^{-1}	Efeitos observados
Mortalidade	7.5%	30%	50%	Em até 5 meses
Entorse na coluna	-	10%	17%	Dificuldade na Natação
Deformação nos olhos	-	-	3%	Dificuldade na Alimentação
Deformação corpo	-	3%	4%	Raquitismo

2.7.3. Reproduções da geração F1: *D. rerio*

Os peixes da geração F1 foram reproduzidos três vezes, em triplicata, durante um ano. Para as reproduções, machos e fêmeas foram escolhidos aleatoriamente, de forma que mesmo os peixes que apresentavam deformidades morfológicas e raquitismo, também pudessem ser escolhidos, para que as análises ficassem mais realísticas com o habitat natural da espécie.

As primeiras reproduções foram realizadas aos cinco meses de idade, mas o número de ovos nas concentrações das reproduções foram significativamente menor que o número de ovos do controle. Na concentração de 0.05 g.L⁻¹, o número médio de ovos (85 ± 20.7) foi 68,5% menor que a média do controle (270 ± 49.5) e na concentração de 0.5 g.L⁻¹, 83.7%. Após sete dias, 34% das larvas sobreviveram no controle (91.6 ± 3.4), mas nas concentrações nenhuma larva sobreviveu (Tabela 3).

Aos oito meses, nas três reproduções realizadas, observou-se que a média o número de ovos nas concentrações foi maior em relação ao controle. A concentração de 0.05 g.L⁻¹ (média, 355 ± 34.7) superou o controle (média, 273.6 ± 45.1) em 23% e a concentração de 0.5 g.L⁻¹ (média, 451.6 ± 38.4) superou em 40%. Em sete dias, as larvas das concentrações não sobreviveram, e no controle, 31.2% (média 85.6 ± 4.5) sobreviveram (Tabela 3).

As reproduções aos onze meses foram próximas às da geração F0, com o número de ovos nas concentrações maior que o controle. A concentração de 0.05 g.L⁻¹ (609 ± 91.5) obteve 28% a mais de ovos que o controle (358.3 ± 99.9) e a concentração de 0.5 g.L⁻¹ (média, 497 ± 94.2) obteve 41%.

Após sete dias, no controle, 24% das larvas sobreviveram (86.3 ± 7.9), na concentração de 0.05 g.L⁻¹ (5.6 ± 1.6), menos de 1% sobreviveu, e na concentração de 0.5 g.L⁻¹, nenhuma larva sobreviveu (Tabela 3).

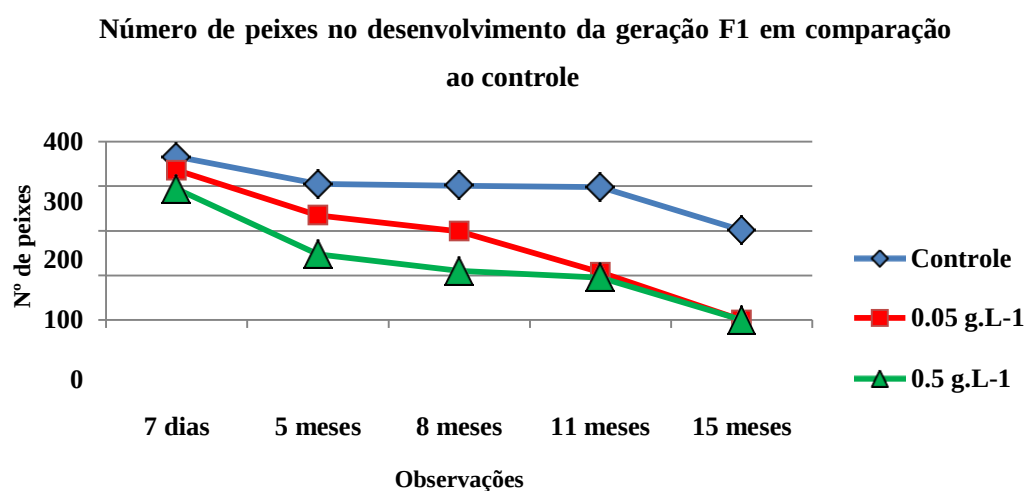
Tabela 3. Médias de ovos e larvas de *D. rerio* das três reproduções da geração F1 aos cinco, oito e onze meses de idade, expostos às concentrações de 0.05 g.L⁻¹ e 0.5 g.L⁻¹ no corante amarelo tartrazina e o controle (* p <0,05).

Média do número de ovos e larvas nas três reproduções da geração F1			
Geração F2 - 5 meses			
	Controle	0.05 g.L⁻¹	0.5 g.L⁻¹
0 hpf	270±49.25	85±20.70*	44±22.37*
24 hpf	198±4.49	35±3.85*	25±8.65*
48 hpf	122±26.6	30±4.96*	9±4.49*
72 hpf	106±23.3	16±1.24*	2±2.05*
Larvas (Após sete dias)	92±3.4	0	0
Geração F2 - 8 meses			
	Controle	0.05 g.L⁻¹	0.5 g.L⁻¹
0 hpf	273±45.16	355±34.75	451±38.44
24 hpf	212±43.25	233±34.53	241±95.81
48 hpf	154±6.80	94±34.10	50±38.9
72 hpf	111±10.7	17±4.49	4±4.96
Larvas Após sete dias	85±4.5	0	0
Geração F2 - 11 meses			
	Controle	0.05 g.L⁻¹	0.5 g.L⁻¹
0 hpf	358±99.95	609±91.50	497±94.27
24 hpf	195±72.79	367±53.32	238±115.86
48 hpf	118±14.52	230±92.29	24±9.67*
72 hpf	97±5.24	67±14.16	1±0.47*
Larvas Após sete dias	86±7.9	6±1.6	0

2.7.3.1. Mortalidade da geração F1

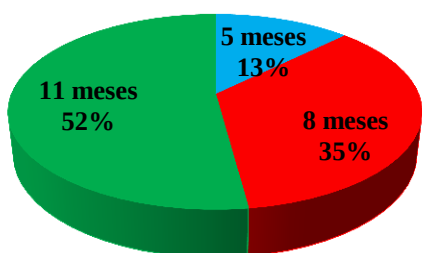
Até os cinco meses, o desenvolvimento dos peixes foram acompanhados diariamente e em oito e onze meses, foram contados (Figura 4) e as deformidades observadas foram calculadas em porcentagens para cada concentração (0.05 g.L^{-1} e 0.5 g.L^{-1}) em relação ao controle (Figura 5 e 6). Após quinze meses, quatro retirados da exposição do corante e colocados em água de cultivo e um mês após as reproduções da recuperação biológica, os peixes morreram e foram analisados e fotografados (Figura 6).

Figura 4. Quantidade de peixes nas contagens de cinco, oito e onze meses de idade, no controle e nas concentrações do corante amarelo tartrazina em 0.05 g.L^{-1} e 0.5 g.L^{-1} .



Figuras 5 e 6. Quantidade de deformidades, em porcentagens, observadas no peixes *D. rerio* durante as contagens de cinco, oito e onze meses de idade nas concentrações do corante amarelo tartrazina em 0.05 g.L⁻¹ e 0.5 g.L⁻¹.

Deformidades observadas na geração F1 de *D. rerio* na concentração de 0.05 g.L⁻¹ em 5, 8 e 11 meses



Deformidades observadas na geração F1 de *D. rerio* na concentração de 0.5 g.L⁻¹ em 5, 8 e 11 meses

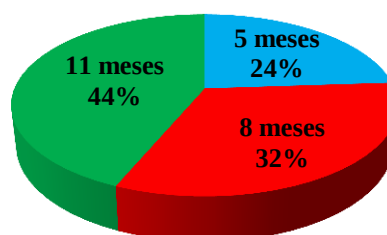
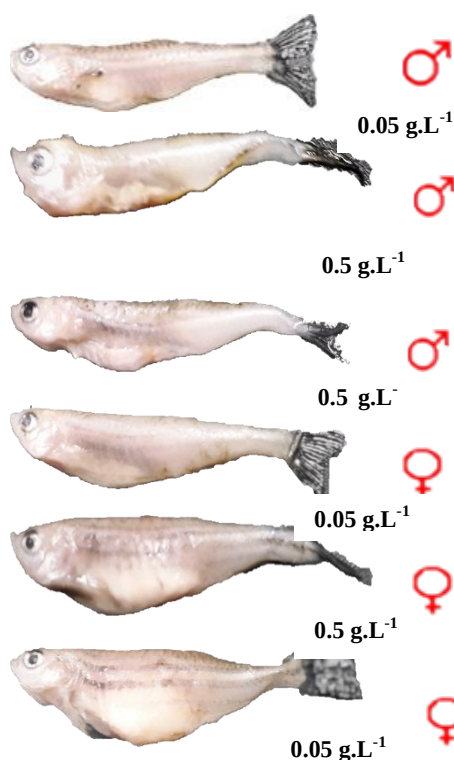


Figura 7. Deformidades morfológicas observadas nos peixes da geração F1 que morreram no aquário após quinze meses: onze meses expostos ao corante amarelo tartrazina desde o nascimento, e quatro meses removidos do corante amarelo tartrazina e colocados em água de cultivo para recuperação biológica.



Ausência de listras verticais; abdômen deformado com sulcos profundos.

Ausência de listras verticais; deformidade na boca; deformidade nos olhos; deformidade na cauda; entorse na coluna; abdômen dobrado.

Deformidade nos olhos, deformidade na cauda; abdômen e órgãos internos contraídos.

Ausência de pigmentação; abdômen e órgãos internos contraídos.

Deformidade na boca; deformidade no abdômen; deformidade na cauda.

Deformidade no abdômen, formação de sulcos na região cardíaca.

2.8. Análises químicas do corante amarelo tartrazina

As análises químicas dos corantes apresentaram, como elementos mais significativos, alumínio, ferro, fósforo, nitrogênio total, potássio e sódio (Tabela 5).

Tabela 5. Elementos químicos mais representativos na composição do corante padrão analítico (PA 100%).

Parâmetros (mg.L ⁻¹)	LQ	PA 100%
Alumínio	0.01	0.016
Ferro	0.01	0.071
Fósforo	0.01	0.46
Nitrogênio total	2.5	24.8
Potássio	0.5	1.22
Sódio	0.5	63.6

Tabela 6. Análise estatística do coeficiente de correlação de Spearman dos elementos químicos dos corantes com o número de neonatos de *D. similis* e número de ovos e embriões de *D. rerio* ($p \leq 0,05$).

<i>D. similis</i>	Alumínio	Ferro	Fósforo	Nitrogênio total	Potássio	Sódio
0.025		+	+	–		
0.05		+	+			
0.4		+	+			
0.8	–			–		
<i>D. rerio</i>	Alumínio	Ferro	Fósforo	Nitrogênio total	Potássio	Sódio
0.05		+	+		+	+
0.5		+	+		+	+

Coeficiente de correlação de Spearman:

+ correlação positiva

– correlação negativa

2.9. Discussão

O corante amarelo tartrazina é um aditivo amplamente utilizado pelas indústrias alimentícias, mas não há estimativas de suas perdas em efluentes industriais, durante o processo de fabricação dos produtos. O corante é mais pesquisado por seus aspectos toxicológicos e pelo impacto que pode causar em humanos, estudos ecotoxicológicos, visando a proteção da vida aquática são praticamente inexistente.

Na presente pesquisa, os resultados sugerem, para *D. similis*, nas concentrações de 0,05 g.L⁻¹ e na concentração de 0,4 g.L⁻¹, o corante induziu os organismos a alterações metabólicas ou bioquímicas e estimulou a reprodução, essas concentrações apresentaram correlação positiva com o ferro e fósforo. O fósforo é importantes na formação estrutural dos organismos (McDowell, 1992); o ferro participa do processo respiratório celular (NRC, 1993).

Os minerais podem interagir entre si, com outros nutrientes e também com alguns fatores não nutritivos da dieta. A interação do tipo sinérgica ou antagônica poderá ocorrer na própria dieta e durante o metabolismo (Moraes, 2009).

Na concentração de 0.025 g.L⁻¹ também houve correlação positiva com o ferro e fósforo, mas esta concentração e a concentração de 0.8 g.L⁻¹ se correlacionaram negativamente com o alumínio e com o nitrogênio total. O nitrogênio é um dos elementos mais importantes no metabolismo de ecossistemas aquáticos, devido à sua participação na formação de proteínas, no entanto, em grande quantidade e em determinadas condições, pode tornar-se tóxico devido aos compostos nitrogenados dissolvidos na água, como o íon amônio e amônia. As duas formas provêm, principalmente da alimentação (Pereira, 2005).

Meireles (2013), em estudos de corantes com cladóceros, avaliou a ecotoxicidade crônica de corantes Reactive Blue 4 (RB 4) em concentrações de 4,74; 7,11; 10,67; 16,00, 24,00 e 36,00 mg L⁻¹ e Reactive Blue 15 (RB 15), nas concentrações de 15, 30, 60, 120 e 240 mg L⁻¹, ambos têxteis, em *Ceriodaphnia dubia*, e o autor concluiu que o corante RB 4 induziu a efeito hormese nos ensaios com *C. dubia*, ou seja, houve um estímulo na reprodução nas concentrações mais baixas, seguido por uma diminuição nas concentrações mais altas, enquanto no corante RB 15, observou-se que houve redução na fertilidade de *C. dubia*.

Na geração F1, recuperação biológica, onde *D. similis* apresentou uma ligeira recuperação, indicando a possibilidade de uma recuperação mais acentuada ao longo do tempo, foi interessante notar que essa geração, cuja geração anterior estivera no corante, apresentou uma distribuição bastante similar aos parentais.

Gama-Flores et al. (2007) observaram que cladóceros expostos a concentrações de metais podem recuperar quando o ambiente se tornar favorável, concluindo que o tempo de exposição, em avaliações ecotoxicológicas, são muito importantes, uma vez que os autores realizaram os ensaios de testes em período de 18 e 24 dias, o que corrobora os resultados deste trabalho, que observou em oito dias, a primeira geração de recuperação biológica não resultou em um número suficiente dos neonatos, porém, houve um maior número de neonatos, em relação aos dos testes de F1 geração continuamente exposta a tartrazina.

Em concentrações menores, (0,003 g.L⁻¹), Hernández-Zamora et al., (2016) estudaram o efeito do corante azo vermelho congo sob uma população de *C. dubia* e concluíram que o corante tinha efeitos tóxicos sobre o taxas de reprodução e sobrevivência do microcrustáceo.

Em relação à reprodução de *D. rerio* exposto a corantes, Moreira (2019) realizou reproduções para comparar os efeitos do corante Índigo Blue e Índigo Natural, não obtendo um número considerável de ovos nos dois corantes após testes crônicos, mas após 21 dias de recuperação biológica obteve 305 ovos (sobrevivência de 278 larvas) e 489 (sobrevivência de 442 larvas) no Índigo Blue e Índigo Natural, respectivamente.

Segundo a ABNT NBR 15499 (2015), uma fêmea produz, em média, 300 ovos durante a desova, com a viabilidade do ovo sendo avaliada em 70 a 90%, e geralmente há perdas significativas devido ao estresse do organismo em condições de laboratório. Comparando esta informação da literatura com esta pesquisa, observa-se que, nas reproduções da geração F0 e nas reproduções da geração F1 (em oito e onze meses), o corante estimulou as reproduções dos peixes expostos, porém, o número de larvas, após 72 hpf (horas pós fertilização) foi muito próxima à do controle, mostrando a perda de viabilidade dos ovos expostos ao corante.

Nesta avaliação, o desenvolvimento de embriões não foi considerado para análise ecotoxicológica, mas a alternativa de "contagem de ovos" para medir os efeitos crônicos por meio de sua viabilidade nas concentrações se mostrou eficaz e pode ser aplicada como metodologia em pesquisa ecotoxicológica, desde que devidamente replicada, como neste estudo.

Houve correlação positiva entre os elementos fósforo, ferro, potássio e sódio presentes no corante com o número de ovos em 3 hpf e 24 hpf. Esses elementos são essenciais ao desenvolvimento dos organismos, o fósforo pode ser citado como participante do processo intermediário da formação da parede intestinal, na atividade das enzimas digestivas, na formação dos ossos (Tacon, 1990) e metabolismo dos lipídios (Moraes, 2009). Entre os principais aspectos avaliados para o ferro, em diferentes espécies e fases do desenvolvimento dos peixes, destaca-se a ação deles no desempenho produtivo, na resistência a doenças, nas

respostas imunológicas, nos parâmetros hematológicos e nas respostas ao estresse (Barros, 2002).

O sódio é um mineral importante na absorção de nutrientes no trato digestório e, juntamente com o potássio, é responsável pelo balanço iônico nos fluidos do corpo do animal (Aguiar, 2018).

Nesta avaliação, o desenvolvimento de embriões não foi considerado para análise ecotoxicológica, mas a alternativa de "contagem de ovos" para medir os efeitos crônicos por meio de sua viabilidade nas concentrações se mostrou eficaz e pode ser aplicada como metodologia em pesquisa ecotoxicológica, desde que devidamente replicada, como neste estudo.

Na geração F1, o corante comprometeu o desenvolvimento e reprodução dos peixes até a idade de cinco meses, quando os peixes nas concentrações atingiram o mesmo comprimento do peixe do controle (20 a 23 mm).

Embora nas reproduções de oito e onze meses, o número de ovos da geração F1 exposta à tartrazina tenha sido maior que o controle, reproduzindo o padrão da geração F0, aos 72 hpf, praticamente não havia ovos viáveis e após sete dias nenhuma larva sobreviveu, confirmando efeito sobre a sobrevivência da espécie.

Os peixes da geração F1, continuamente expostos no corante até os onze meses de idade e removido para recuperação biológica por três meses em água de cultivo, não se recuperaram biologicamente, fato evidenciado pela ausência de larvas nas concentrações dos corantes em 72 hpf.

O tempo de recuperação biológica para este estudo foi menor em comparação com Nash et al. (2004) que descobriram que a capacidade reprodutiva de *D. rerio* é parcialmente recuperável cinco meses após o fim da exposição ao hormônio 17-alfa-etinilestradiol. A literatura relata a capacidade de recuperação biológica de *D. rerio* abordando apenas a geração F0 (Van den Belt et al. 2002, Larsen et al. 2009), no estudo em questão a capacidade de recuperação não é evidente quando avaliado em multi-gerações continuamente expostas.

Neste trabalho, o corante amarelo tartrazina causou impactos ecotoxicológicos nos níveis tróficos estudados, portanto salientamos a importância no controle e monitoramento de seu uso nos diversos produtos alimentares, pois a quantidade que é liberada nos ecossistemas aquáticos não é regulamentada.

2.10. Conclusões

A composição química do corante determinou a distribuição de *D. similis* e a quantidade de ovos e embriões em *D. rerio*. As correlações positivas observadas com elementos essenciais ao desenvolvimento estimularam as reproduções. Para *D. similis*, na geração F0, houve estímulo reprodutivo nas concentrações de 0,05 g.L⁻¹ e 0,4 g.L⁻¹ e em *D. rerio* houve estímulo na duas reproduções, mas com número de ovos maior na concentração de 0.5 g.L⁻¹.

Os elementos alumínio e nitrogênio total causaram ecotoxicidade na concentração de 0,025 g.L⁻¹ em *D. similis* e diminuição no número de neonatos na concentração de 0.8 g.L⁻¹.

Apesar do número de neonatos ser maior na recuperação biológica em relação ao número de neonatos expostos continuamente ao corante na geração F1 de *D. similis*, não houve recuperação biológica da espécie.

A qualidade dos ovos da geração F0 de *D. rerio* exposta em diferentes concentrações de tartrazina, quando comparadas ao controle, indicaram maior quantidade de ovos colocado, porém de baixa qualidade, pois o número de larvas resultantes ficou bem abaixo do número de larvas do controle.

As reproduções da geração F1 de *D. rerio* aos oito e onze meses de idade seguiram o mesmo padrão da geração F0 com um maior número de ovos nas concentrações do corante em comparação ao controle, caracterizando que o corante estimulou as reproduções, no entanto, comprometeu totalmente a espécie, pois em nenhuma reprodução, ao longo de onze meses, houve larvas sobreviventes nas concentrações.

O corante causou as mesmas deformidades morfológicas e em porcentagens iguais nas concentrações de 0.05 g.L⁻¹ e 0.5 g.L⁻¹, portanto não houve concentração segura para a espécie.

As deformidades apresentadas pelo *D. rerio post mortem* da geração F1, causadas pela exposição ao corante tartrazina impactaram seu ciclo de vida e comprometendo sua reprodução e o desenvolvimento das gerações futuras.

Referências

- Aguiar, NC, (2018). Inclusão de cloreto de sódio (NaCl) na ração para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná. 57p.
- APHA – American Public Health Association, (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington:APHA. 1360 pp.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR 12713 (2016) Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Test method with *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR 15088 (2016) Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Fish test method (*Cyprinidae*). Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR 15499 (2016) Aquatic ecotoxicology - Short-term chronic toxicity - Fish test method. Rio de Janeiro.
- Anderson SL, Wild GC (1994) Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. Environ Health Perspect 102(12):9–12
- Antilo A, Bernadino L (1995) The role of additives in chronic pseudo-allergic dermatopathies from food intolerance. Allerg Immunol 27:157-60
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR 12.648 (2011) Aquatic Ecotoxicology - Chronic toxicity - Test method with algae (Chlorophyceae). Rio de Janeiro.
- Ayres M, Ayres DL, Santos AAS, Ayres-Junior M, Ayres D, SANTOS A, ... and Ayres M (2007) BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.. Belém: Publicações Avulsas do Mamirauá.
- Barros, MM, Pezzato, LE, Kleemann, GK, Hisano, H., Rosa, GJM (2002). Níveis de Vitamina C e Ferro para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). R. Bras. Zootec., v.31, n.6, p.2149-2156.
- Borzelleca JF, Hallagan JB (1988) Chronic toxicity/carcinogenicity studies of FD & C Yellow No.5 (Tartrazine) in rats. Food and Chemical Toxicology 26:179-187
- Chung KT, Fulk GE, Egan M (1978) Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. Applied and Environmental Microbiology 35:558-562
- Codex Alimentarius (2015) General Standard for Food Additives, Codex Stan 192-1995. Food and Agriculture Organization of The United States and World Health Organization

- Collins TF, Black TN, Brown LH, Bulhack P (1990) Study of teratogenic potential of FD & C Yellow N° 5 when given by gavage to rats. *Food Chem Toxicol* 28(12): 821-827
- Collins TF, Black TN, O'Donnell MW Jr, Bulhack P (1992) Study of teratogenic potential of FD & C Yellow N° 5 when given in drinking water. *Food Chem Toxicol* 30(4): 263-268
- CONAMA. Resolução No. 357 (2005) It provides for the classification of bodies of water and environmental guidelines for their classification, as well as establishing the conditions and standards for the discharge of effluents, and other measures. Brasil 27 p.
- CONAMA. Resolução No. 430 (2011) Provides for the conditions and standards for the discharge of effluents, complements and amends Resolution No. 357/2005, of the National Environment Council Brasil. 9 p.
- Cosmoquímica Indústria e Comércio LTDA (2009) Chemical safety information sheet - tartrazine yellow dye. Technical report. <http://cosmoquimica2.tempsite>. Accessed 13 January 2020
- Costa PM (2011) Avaliação do efeito tóxico de sulfato de alumínio e sulfato de cobre em bioensaio de contaminação subcrônica via trófica no bioindicador *Rhamdia quelen* (siluriforme). Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, PR. 130p.
- Dammski AP, Muller BR, Gaya C, Regonato D (2011) Zebrafish-Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná 20-1.
- Del Giovine L, Bocca AP (2003) Determination of synthetic dyes in ice cream by capillary electrophoresis. *Food Control* 14:131-135
- Doguc DK, Ceyhan BM, Ozturk M, Gultekin F (2012) Effects of maternally exposed colouring food additives on cognitive performance in rats. *Toxicology and Industrial Health* 29(7):616-623.
- Dynatech Indústrias Químicas LTDA. (2016) Chemical safety information sheet No. Dynac-006 tartrazine yellow dye. Yellow technical report Dynacid G. CR.E09.0002 São Paulo, (personally acquired with the company on 09/22/2017)
- El-Wahab HMFA, Moram GSE (2012) Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health* 29(2):224-232
- EPA US – United States Environmental Protection Agency. (1992). Method 3010A: Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts for Total Metals for Analysis by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FLAA) or Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICP), 1 st edn. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

European Commission – EC (1995) Commission Directiva 95/45/CE of July 26, 1995, which establishes specific purity criteria for dyes that can be used in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, L 226 of 9.22.1995.

FDA US Food & Drug Administration - CRF- Code of Federal Regulations (2019) Title 21. 74.705 FD & C Yellow No. 5. www.ata.fda.gov. Accessed 16 March 2020.

Gama-Flores JL, Castellanos-Paez ME, Sarma SSS, Nandini S (2007) Life table demography of *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) exposed to copper at different levels and periods. Journal of Environmental Biology 28(3):691-696.

Golka K, Kopps S, Myslak WZ (2004) Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. Toxicol Lett 15:203–210

Hernández-Zamora M, Cristiani-Urbina E, Martínez-Jerónimo F et al. (2015) Bioremoval of the azo dye Congo Red by the microalga *Chlorella vulgaris*. Environ Sci Pollut Res 22:10811–10823. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4277-1>.

Joint Fao/Who Expert Committee On Food Additives – JECFA (2006) Evaluation of certain food contaminants (Sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series No. 930

Joint Fao/Who Expert Committee On Food Additives – JECFA (2012) Laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) n° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012. Official Journal of the European Union, L 83/1, 22.3.2012

Joshi V, Pancharatna K (2017) Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. International Journal of Toxicology 37(1):38-44.

Kashanian S, Zeidali SH (2011) Binding Studies of Tartrazine Food Additive. DNA and Cell Biology 30(7):499-505

Khayyat L, Essawy A, Sorour J, Soffar A (2017) Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects in vivo. Peer J. 5:3041-3055

Larsen MG, Bilberg K, Baatrup E (2009) Reversibility of estrogenic sex changes in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry 28:1783-1785. DOI:10.1897/08-563.1

Linskens A (2018) The Long Term Effects of Tartrazine (FD&C Yellow No. 5) on Learning, Cognitive Flexibility, and Memory of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos into Adulthood. people.uwm.edu. Accessed 7 March 2020

McDowell, L. R. (1992). Minerals in Animal and Human Nutrition, Academic Press: London.

Marmitt, S; Pirotta, L. V.; Stülp, S. (2010). Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. Química Nova, v. 33, n. 2, p. 384-388, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n2/27.pdf>>. Acesso em: 02. Mar. 2018

Meireles G (2013) Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15. Dissertation, University of São Paulo

Moraes, P.M., Loureiro, V. R., Padilha, P. M. (2009). Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. Quim. Nova, Vol. 32, No. 4, 923-927.

Moreira SC (2019) Aspectos ecotoxicológicos do corante índigo sintético e natural – com organismos teste *D. rerio* e *R. subcapitata*. Dissertation, Paulista State University, Sorocaba

Nash JP, Kime DE, Van der Ven LTM, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P, Tyler CR (2004) Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinyles- triadiol causes reproductive failure in fish. Environ Health Perspect 112:1725–1733.

National Research Council (1993). Nutrient Requirements of fish. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/2115>.

OECD - Draft guidance document on the threshold approach for acute fish toxicity 1 testing (2010) OECD Project 2.23, Organisation for Economic Cooperation and Development, 2 Paris. 4pp.

OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development (2012) Test No. 229.2012: Fish short term reproduction assay. Paris.

Ostroski, I.; Bariccatti, RA.; Lindino, CA. (2005). Estabilidade dos corantes Tartrazina e Amarelo Crepúsculo. Acta Sci. Technol., v. 27, n. 2, p. 101 – 106, 2005.

Pereira, LPF and Mercadante, CTJ (2005). A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. B. Inst. Pesca, São Paulo, 31(1): 81 - 88.

Polônio MLT, Peres F (2009) Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. Cad Saúde Pública 25(8)

Prado MA, Godoy HT (2003) Corantes artificiais em alimentos. Alimentos e Nutrição. 14(2):237-250. <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer>.

Sleiman M; Vildoso, D; Ferronato, C; Chovelon, J. Photocatalytic degradation of azo dye Metanil Yellow: Optimization and kinetic modeling using a chemometric approach. Applied Catalysis B: Environmental, v. 77, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

Tacon AGJ (1990). Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. The Essential Nutrients, Argent Laboratories Press: Washington, 1990, vol. 1.

Tanaka T, Takahashi O, Oishi S, Ogata A (2008) Effects of Tartrazine on exploratory behavior in a three-generation toxicity study in mice. Reproductive Toxicology 26:156–163

Van den Belt K, Wester PW, Van der Ven LTM, Verheyen R, Witters H (2002) Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:767-775. DOI:10.1002/etc.5620210412

Zollinger H (1991) *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. WILEY - VCH

Capítulo 3: Ecotoxicidade do corante amarelo tartrazina em embriões de *Danio rerio* após exposição multigeracional

Resumo

Pesquisas toxicológicas descrevem o impacto que o corante amarelo tartrazina pode ter na saúde humana, porém pouco se sabe sobre seu impacto ecotoxicológico no meio ambiente. Para entender o desempenho ecotoxicológico deste aditivo, este trabalho utilizou testes de toxicidade com o peixe *Danio rerio* expostos ao corante amarelo tartrazina, para avaliar os potenciais efeitos reprodutivos em duas gerações consecutivas. A metodologia do teste consistiu em expor o organismo aos corantes Padrão Analítico 100% (PA) nas concentrações de 50 e 500 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹ Padrão Comercial 86% (PC). Essas concentrações foram estabelecidas de acordo com os valores mínimos e máximos permitidos nos alimentos de acordo com o Codex Committee on Food Additives (CCFA). De acordo com os resultados, os aditivos produziram maior número de ovos nas gerações parentais e F1 expostas quando comparadas aos controles. O corante influenciou o desenvolvimento dos peixes da geração F1, causando deformidades (entorses de coluna, deformidades nos olhos e no corpo) e mortalidades durante seu desenvolvimento. Nos embriões da geração F1, nas 24 horas pós-fecundação observou-se desenvolvimento tardio, deformações no saco vitelino e ausência de somitos. Os diferentes corantes tartrazina testados têm os mesmos potenciais embriotóxicos em *D. rerio*. Conclui-se, portanto, que o aditivo estimula a reprodução, mas, compromete sua qualidade e viabilidade, podendo impactar seriamente a vida aquática.

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Corante azo; Peixe; Reprodução; Embriões, Ovos.

3.1. Introdução

O corante amarelo tartrazina é utilizado em diversos segmentos industriais como papel, couro, têxtil, cosmético, farmacêutico e alimentício, devido a sua alta estabilidade, firmeza de cores e nuances de coloração que pode proporcionar a diversos produtos. O aditivo alimentar é descrito na literatura como cancerígeno e está relacionado a problemas dermatológicos e respiratórios (Prado & Godoy 2003) como urticária, broncoespasmo, rinite, angioedema, além de hiperatividade em crianças (Polônio & Peres 2009). Também é considerado alergênico (Matsuo et al. 2013).

Muitos trabalhos pesquisaram os efeitos toxicológicos do corante para a saúde humana, porém poucos abordaram seus efeitos para o meio ambiente, nesse sentido, poucas pesquisas foram realizadas e estas, utilizaram o organismo *D. rerio*.

Joshi & Pancharatna (2017) avaliaram o efeito ecotoxicológico da tartrazina em *D. rerio* na fase embrionária, e não encontraram efeitos letais e quaisquer deformidades morfológicamente visíveis em concentrações de 0 - 26,7 mg.L⁻¹. No entanto, eles observaram que em concentrações de 53 a 80 mg.L⁻¹, o aditivo causava anormalidades, como deformidades cardíacas e em concentrações superiores a 80 mg.L⁻¹, bradicardia foi observada de forma proeminente junto com frequência cardíaca deficiente, distorção da cauda e edema do saco vitelino, além de letalidade em concentrações mais altas (133 - 267 mg.L⁻¹).

Motta et. al., (2019) também observaram deformações embrionárias no desenvolvimento de *D. rerio*. Os autores utilizaram outros dois níveis tróficos diferentes, (*Cucumis sativus* e *Artemia salina*) ao corante tartrazina de concentração de 1,2 g.L⁻¹, observaram um aumento na germinação com taxa de brotação reduzida em *C. sativus* mortalidade e baixa mobilidade em *A. salina*.

Apesar desses trabalhos citados, ainda há muito pouco sobre as abordagens toxicológica e ecotoxicológica do corante que tem ampla adesão nas indústrias alimentícias devido a sua facilidade nos processos de produção e sua resistência à degradação, bem como seu baixo custo e fácil aplicação em produtos mais diversos nas indústrias.

Os efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos estão diretamente relacionados às propriedades biológicas dos organismos expostos, ao tempo de exposição, à dose ou concentração e às propriedades físicas e químicas dos contaminantes.

O corante tartrazina é um corante azo que é descrito na literatura como genotóxico devido às suas interações com as moléculas do sangue (Basu and Kumar, 2016; Golli et al., 2016), causa mudanças comportamentais e alterações no desenvolvimento dos organismos aquáticos (Linskens, 2018; Joshi and Pancharatna, 2017; Gupta et al., 2019; Jiang et al., 2019; Silva and Fracácio, 2020). Por ser um corante solúvel em água, seu lançamento em corpos d'água é uma das maiores preocupações ambientais e sua cor, dependendo da quantidade liberada, pode interferir no processo de fotossíntese. Essa solubilidade na água está relacionada à presença de grupos cromóforos, carboxílicos, nitro, hidroxila e amino, que são capazes de aumentar a intensidade de absorção específica do corante (Del Giovine & Bocca 2003).

O corante amarelo tartrazina é geralmente feito da diazotização do ácido aminobenzeno 4 com ácido nítrico e nitrito de sódio. Os principais componentes encontrados no corante são cloreto de sódio e / ou sulfato de sódio e, especialmente os itens que estão presentes no corante alimentar são cálcio, sais de potássio e pequenas quantidades de metais potencialmente tóxicos como o mercúrio ($\leq 1 \text{ mg kg}^{-1}$); arsênio ($\leq 3 \text{ mg kg}^{-1}$) e chumbo ($\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$) (FDA 1985; Diretiva da Comissão Europeia 2008/128 / EC).

Uma grande variedade de aplicações do corante e consequentemente seu impacto constante no meio aquático associado à escassez de dados ecotoxicológicos é evidente na literatura. Nesse sentido, esta pesquisa visa contribuir com a literatura, avaliando os efeitos reprodutivos, embriológicos e ecotoxicológicos da espécie *D. rerio* expostos a diferentes corantes tartrazina em duas gerações e pretende responder às seguintes questões: 1) O uso constante do corante amarelo tartrazina em alimentos, mesmo nas concentrações permitidas pela legislação pertinente, é seguro para a proteção dos organismos aquáticos? 2) Considerando a exposição crônica de *D. rerio* ao corante, por duas gerações, os aspectos reprodutivos e de desenvolvimento embrionário podem ser considerados *endpoints* seguros, do ponto de vista ecotoxicológico, para a segurança ambiental? 3) O grau de pureza dos corantes mais utilizados pelas indústrias alimentícias interfere em sua ecotoxicidade nos ambientes aquáticos? 4) Quais serão os *endpoints* na análise de *D. rerio*, após duas reproduções, com diferentes intervalos de exposição, mas mantendo as mesmas concentrações do corante?

3.2. Desenho experimental

3.2.1. Testes ecotoxicológicos

Adultos de *D. rerio* foram colocados em aquários de 2 L com água reconstituída sem cloro, tratada com filtros de carvão ativado. As variáveis dureza e pH foram ajustadas para 44 mg CaCO₃ L⁻¹ e 7,5 ± 0,5, respectivamente. A temperatura permaneceu em 26 ± 1 °C e o fotoperíodo foi mantido com 12h claro: 12h escuro OECD (2012). As concentrações de 500 e 50 mg.L⁻¹ foram preparadas com o corante Padrão Analítico 100% (PA) Dynatech® e Padrão Comercial 86% (PC), Sigma Aldrich®, em concentração de 50 mg.L⁻¹.

Após os testes de sensibilidade com NaCl (ABNT NBR 15499/2016), para averiguar a adaptação dos peixes em laboratório, foram iniciados os testes com a tartrazina. Durante o teste, os organismos adultos foram alimentados com ração para peixes Tetramin® (97% de proteína bruta) duas vezes ao dia e, a partir do 15º dia de exposição (uma semana após o término do período experimental e acasalamento), nauplios de artemia salina foram introduzidas como um suplemento alimentar, uma vez ao dia “*Ad libitum*”.

Os peixes do primeiro ensaio, geração F0, permaneceram sob a influência dos corantes por vinte e um dias, enquanto os peixes controle permaneceram apenas na água reconstituída, pelo mesmo período experimental. Após o período de exposição, foram montados os aquários de criação, com uma fêmea para cada dois machos (ABNT NBR 15499/2016).

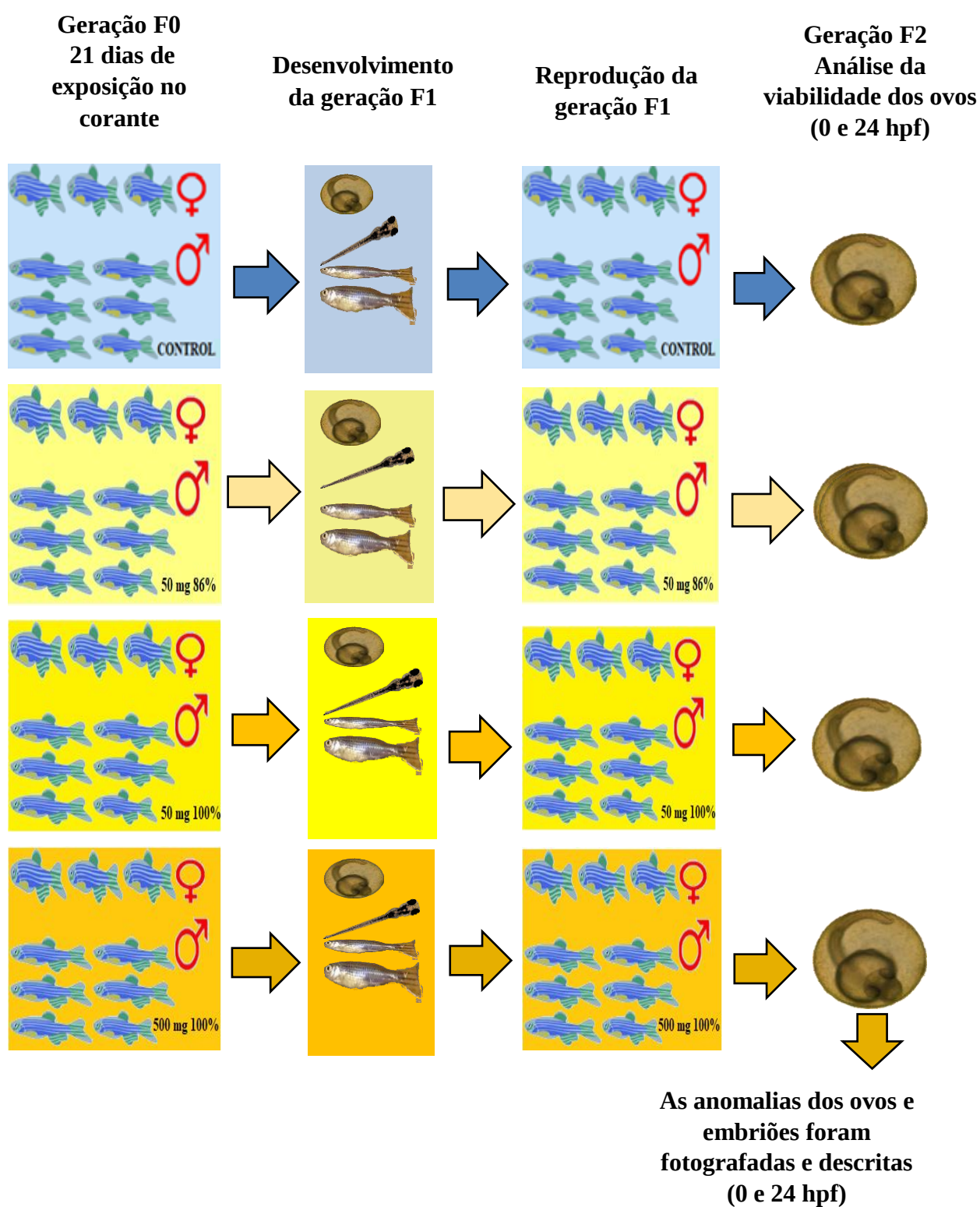
No 21º dia, em cada situação experimental, para a análise dos aspectos reprodutivos, foram selecionados dezoito machos e nove fêmeas para cada padrão e concentração do corante, bem como para os peixes controle. Na montagem dos aquários de acasalamento, três fêmeas e seis machos foram expostos, em triplicata, para cada padrão e concentração do corante, inclusive para os peixes controle.

No 22º dia, foram contados os ovos viáveis de acasalamento de cada um dos aquários de acasalamento (que seguiram um processo de lavagem em solução de lixiviação (250 µL NaClO L⁻¹) por períodos de 0 e 24 horas após a fertilização, para evitar contaminação por fungos. As larvas eclodiram 48 horas após a fertilização e foram acompanhadas por sete dias até receberem ração composta de ração de tetramina diluída em água com fermento biológico e seu desenvolvimento foi monitorado até a idade adulta.

De 0 hpf (horas pós fertilização) à idade adulta, ovos, larvas, peixes jovens e adultos permaneceram nas concentrações de seus respectivos contaminantes e os peixes controle permaneceram apenas na água reconstituída. As condições de exposição em todas as fases foram mantidas constantes. Os peixes foram considerados adultos quando atingiram 22 mm de comprimento (Dammski et al. 2011) e aos onze meses de idade foram submetidos a testes de acasalamento como o descrito para a geração F0 e os mesmos parâmetros foram usados para avaliar a número de ovos viáveis (geração F1). Foram acompanhados os desenvolvimentos de larvas e adultos e suas análises morfológicas, com padrões normais e alterados, foram baseadas nas descrições da OCDE, 236 (2013) (Figura 1).

Nas análises morfológicas, ovos da geração F1 (geração F2) exposta aos corantes, de todas as concentrações (50 mg.L⁻¹ PC 86%; 50 e 500 mg.L⁻¹ PA) e também dos peixes controle foram coletados e tomadas para montagem de análises qualitativas. Cinco ovos foram escolhidos aleatoriamente para cada poço em placas de cultura de células (24 poços com 2,0 cm de profundidade x 1,5 cm de diâmetro, em 2 mL das concentrações), perfazendo um total de 120 ovos para cada período de observação, mais o controle em água reconstituída. Quando deformidades foram encontradas, foram fotografadas em microscópio óptico (Leica Application Suite - DM 3000 LED) em aumentos de 500 e 1000 vezes, e as deformidades foram descritas em detalhes. Os parâmetros químicos pH, dureza e condutividade (OECD 236) foram monitorados para cada poço de observação (Figura 1).

Figura 1. Desenho experimental da metodologia utilizada para análise das reproduções da geração F0 e F1. Três aquários com três fêmeas e seis machos foram utilizados para cada concentração do corante tartrazina: 50 mg.L⁻¹ PC; 50 mg.L⁻¹ PA, 500 mg.L⁻¹ PA e controle (sem corante).



3.3. Análise química do corante tartrazina

A curva de calibração foi traçada usando o comprimento de onda de 427 nm da tartrazina (Nº Fisqp Dynac 006 -Dynatch 2016) na resolução de 0,01 do espectrofotômetro UV-1800, 12:12h fotoperíodo. A concentração de 16 g.L⁻¹ como solução estoque foi preparada para o padrão comercial 86% e a concentração de 10 g.L⁻¹ foi preparada como solução estoque para o padrão analítico 100% e a partir destas, soluções de 0; 1;5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg L⁻¹ foram preparadas para manter uma relação linear entre as variáveis e avaliar a relação entre o grau de pureza da substância e sua degradação e em períodos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h, foram removidos aliquotas do corante para medir o pH, oxigênio dissolvido e a condutividade.

A determinação dos metais dos corantes padrão analítico (PA) e padrão comercial (PC) foi feita por espectrometria de emissão de plasma: método de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) de acordo com o método 3120B (APHA 2012). As amostras foram preparadas de acordo com EPA US 3010A (1992). Seguindo as recomendações dos Métodos Padrão (APHA 2012) as concentrações de nitrogênio total usando o método 4500 A, nitrato usando o método 4110 B e nitrito usando o método 4500 B.

3.4. Análises estatísticas

O número total dos ovos do *D. rerio* nas reproduções de cada geração e cada concentração foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk após a análise multivariada de Bartlett e, em seguida, ao teste estatístico ANOVA e, posteriormente, a comparações múltiplas por Tukey. Nas análises de correlação entre o número de ovos (3 hpf) e de embriões (24 hpf) com os elementos químicos da composição dos corantes tartrazina foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados das imagens com deformidades de ovos foram analisados pelo teste de Fisher. Os programas estatísticos, BioEstat 5.3 (Ayres 2007) e Toxstat 3.5 (West Inc. & Gulley 1996) também foram usados.

3.5. Resultados

3.5.1. Degradação do corante amarelo tartrazina

O corante não degradou dentro do período de 96h demonstrando estabilidade da molécula a partir das análises de pH dos corantes PC 86% (Figura 2), (Tabela 1) e PA 100% (Figura 3, Tabela 2). O pH permaneceu dentro da faixa de 7,2 – 7,7 atribuindo caráter básico a solução, e através das curvas de calibração dos corantes com PC 86% de equação: $y = 0,0356x - 0,0115$, com coeficiente de determinação $R^2=0,09994$ (Figura 2) e PA 100% de equação: $y = 0,0626x - 4E-05$ com coeficiente de determinação $R^2=0,09998$ (Figura 3).

A relação entre pH e degradação do corante tartrazina foi estudada, sendo que o processo de degradação do corante depende primordialmente do pH da solução. Em pH mais ácidos, a degradação é acelerada por um mecanismo de redução do corante e posterior clivagem. (Ostroski et al., 2005). Sendo assim a estabilidade do corante neste caso foi confirmada, não só pela grande estabilidade da molécula (Marmitt et al., 2010; Sleiman et al., 2007), mas também pela continuidade do pH na faixa de 7,0, não resultando em uma solução ácida, o que favoreceu a não degradação do corante.

O oxigênio dissolvido permaneceu maior que $3,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e a condutividade ficou abaixo de 7 mS. A tartrazina possui alta solubilidade em meio aquoso, devido à presença de cromóforos, grupos carboxílicos, nitro, hidroxí e amino que são capazes de aumentar os intensidade de absorção do corante (Del Giovine e Bocca 2003), portanto de difícil descoloração.

Figura 2. Curva de calibração da degradação do corante amarelo tartrazina PC 86%, a partir da concentração de 16 g.L⁻¹

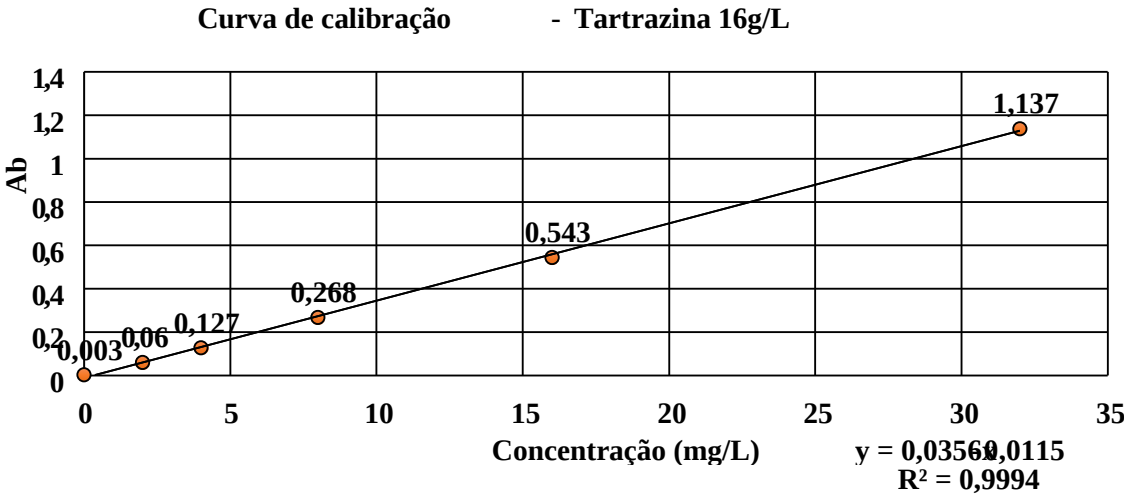


Tabela 1. Análises de pH e concentração nos diferentes tempos (PC 86%)

CONTROLE	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,7	7,5	7,5	7,4	7,4	7,3	7,3
AMOSTRA 1	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,6	7,4	7,4	7,4	7,3	7,3	7,2
Concentração (mg/L)	32,28	33,42	33,34	33,33	33,81	34,04	34,24
	32,27	33,41	33,34	33,35	33,8	34,05	34,24
AMOSTRA 2	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,5	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,3
Concentração (mg/L)	32,41	33,71	33,62	33,39	33,85	34,22	34,36
	32,38	33,73	33,63	33,39	33,85	34,21	34,36
AMOSTRA 3	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,5	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,3
Concentração (mg/L)	32,6	33,71	33,8	33,62	33,8	34,04	34,44
	32,61	33,71	33,78	33,63	33,8	34,05	34,44

Fonte: Autoria própria.

Figura 3. Curva de calibração da degradação do corante amarelo tartrazina PA 100%, a partir da concentração de 10 g.L⁻¹

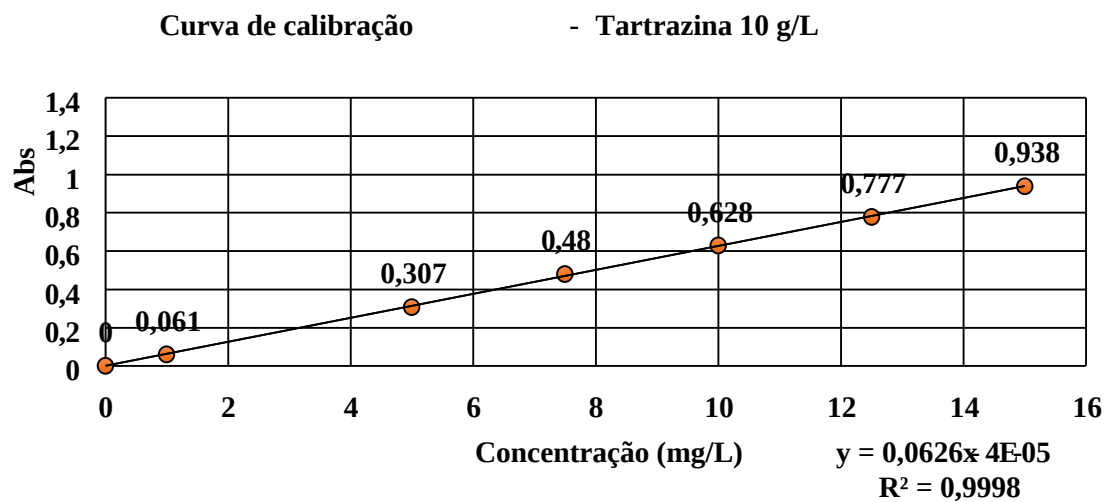


Tabela 2. Análises de pH e concentração nos diferentes tempos (PA 100%)

CONTROLE	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,6	7,7	7,5	7,4	7,3	7,3	7,3
AMOSTRA 1	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,6	7,6	7,5	7,7	7,3	7,2	7,2
Concentração	31,96	32,69	32,56	32,65	32,7	32,66	32,49
(mg/L)	32,03	32,69	32,57	32,62	32,72	32,62	32,49
AMOSTRA 2	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,6	7,5	7,4	7,6	7,2	7,3	7,2
Concentração	32,05	32,52	32,66	32,57	32,57	32,37	32,56
(mg/L)	32,1	32,89	32,68	32,67	32,67	32,32	32,55
AMOSTRA 3	Início	6h	12h	24h	48h	72h	96h
PH	7,6	7,5	7,5	7,5	7,3	7,3	7,3
Concentração	32,08	32,54	32,59	32,5	32,34	32,41	32,45
(mg/L)	32,06	32,52	32,59	32,5	32,34	32,42	32,54

Fonte: Autoria própria.

3.5.2. Reprodução de testes de toxicidade crônica de *D. rerio*

3.5.2.1. Geração F0

Durante os testes de 21 dias de geração F0, nenhum efeito tóxico nos peixes foi observado. Nas reproduções, porém, utilizando os mesmos parâmetros, um maior número de ovos foi obtido nos tratamentos dos organismos expostos ao corante em relação ao controle. Na concentração de 500 PA, a maior média de ovos (636 ± 63) foi obtida, mais de 100% do que a média dos peixes controle (313 ± 11). Após onze dias, o controle produziu 40% de larvas a partir do número inicial de ovos, enquanto apenas 26% das larvas foram produzidas na concentração de 50 PC, 21% na concentração de 50 PA e 15% e na concentração de 500 PA (Tabela 3).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o número de ovos viáveis no controle e as concentrações de 50 PC, 50 PA e 500 PA apenas na primeira contagem (0 hpf) porém, após 24 hpf, a inviabilidade dos ovos em concentrações foi semelhante à do controle (Tabela 3).

Tabela 3. Número médio de ovos e larvas obtidos nas reproduções da geração F0 de peixes-zebra submetidos às concentrações de 50 mg.L⁻¹ PC e 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA dos corantes tartrazina e o grupo de controle (* $p < 0,05$).

Média do número de ovos, embriões e larvas (n=3) das reproduções da geração F0				
Hpf	Geração F1			
	Controle	50 PC	50 PA	500 PA
0	313 ± 11	$549 \pm 53^*$	$540 \pm 54^*$	$636 \pm 63^*$
24	295 ± 8	466 ± 32	430 ± 39	487 ± 66
48	276 ± 8	379 ± 54	344 ± 24	373 ± 58
72	258 ± 8	311 ± 51	281 ± 20	301 ± 102
Após sete dias (larvas)	122 ± 27	145 ± 12	112 ± 11	98 ± 5

± Desvio padrão

3.5.2.2. Geração F1

No desenvolvimento da geração F1 dos peixes expostos aos corantes desde o nascimento até os três meses, foram observadas muitas deformidades, como entorses na coluna que refletiam na dificuldade de nadar; deformidade nos olhos e no corpo, dificultando a alimentação dos peixes (Tabela 4). Aos três meses de idade, os peixes controle eram 60% maiores em peso e comprimento do que os peixes expostos ao corante. Aos onze meses, todos os peixes expostos aos corantes equiapararam-se ao controle e três reproduções foram realizadas em triplicata (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagens de deformidades observadas durante o desenvolvimento dos peixes F1 nas concentrações do corante e do controle.

Deformidades Morfológicas Observadas					
	Geração F1				Efeitos observados
	Control e	50PC	50PA	500P A	
Mortalidade	7.5%	25%	30%	50%	Em até 3 meses
Entorse na coluna	-	10%	10%	17%	Dificuldade de nadar
Deformação nos olhos	-	5%	-	3%	Dificuldade de se alimentar
Deformação no corpo	-	-	3%	4%	Raquitismo (perda de peso)

3.5.2.2.1. Reproduções geração F1

O número de ovos obtidos nos experimentos de acasalamento da geração F1 expostos às concentrações do corante foi maior do que o número de ovos obtidos no controle. Os peixes expostos a 50 PC (média, 1.065 ± 95), contribuíram com quase 200% a mais de ovos do que o controle (média 358 ± 99). Nas concentrações do corante PA 50 e PA 500, obtiveram-se médias 609 ± 91 e 497 ± 94 , respectivamente, que foram 70% e 39% maiores que o controle (Tabela 5).

Em 24 hpf, a média de ovos de controle viáveis (195 ± 72) foi de 55% da média inicial; na concentração de 50 PC, (média 835 ± 75) foi de 78% e nas concentrações de 50 PA e 500 PA foram, respectivamente, 60% (média, 367 ± 57) e 48% (média de 238 ± 115) (Tabela 5). Comparando as reproduções da geração F0 com a geração F1; a geração F1 apresentou o maior número de ovos viáveis a 0 hpf nas concentrações de 50 PC (1.065 ± 95) e 50 PA (609 ± 91) (Tabela 3). No entanto, a maior concentração de 500 PA foi 22% menor (497 ± 94), enquanto na geração F0 (636 ± 63), excedeu o controle em mais de 50% (Tabela 5).

Nas análises estatísticas, na geração F0 houve diferença significativa entre as médias das concentrações do corante de 50 PA, 500 PA e 50 PC a 0 hpf em relação ao controle. Com relação à geração F1, houve diferenças significativas em 50 PC a 0 e 24 hpf (horas pós fertilização).

Tabela 5. Comparação das médias do número de ovos viáveis obtidos a 0 e 24 hpf (horas pós fertilização) da geração F1 nas concentrações de 50 mg.L^{-1} PC, 50 mg.L^{-1} PA e 500 mg.L^{-1} PA e o controle (* $p < 0,05$).

Média do número de Ovos e Embriões (n=3) das reproduções da geração F1- Geração F2

Hpf	Controle	50 PC	50 PA	500 PA
0	358 ± 99	$1.065 \pm 95^*$	609 ± 91	497 ± 94
24	195 ± 72	$835 \pm 75^*$	367 ± 57.3	238 ± 115

± Desvio padrão

3.5.3. Observações morfológicas de ovos de *D. rerio* de 3 hpf e 24 hpf

Em 3 hpf, em todas as concentrações havia mais de 40% de ovos coagulados e, no controle, 30%. Após 24 horas, mais ovos coagulados foram observados nas concentrações, 50 PC (40%), 50 PA (36%) e 500 PA, (27 %), respectivamente (Figura 4). O crescimento retardado foi observado em cerca de 14% dos embriões para as três concentrações, diferindo significativamente do controle (Figura 4). Embriões sem movimento também eram recorrentes e, em menor grau, deformidades no saco vitelino e cauda curvada nos embriões (Figura 4).

Os embriões com deformidades, foram analisados e fotografados (Figura 5).

Figura 4. Deformidades encontradas aos 3 e 24 hpf (horas pós fertilização) nos embriões de *D. rerio* da geração F1 que foram submetidos aos corantes tartrazina, 50 mg.L⁻¹ PC, 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA e grupo controle e resultados estatísticos do teste de Fisher (* p <0,05).

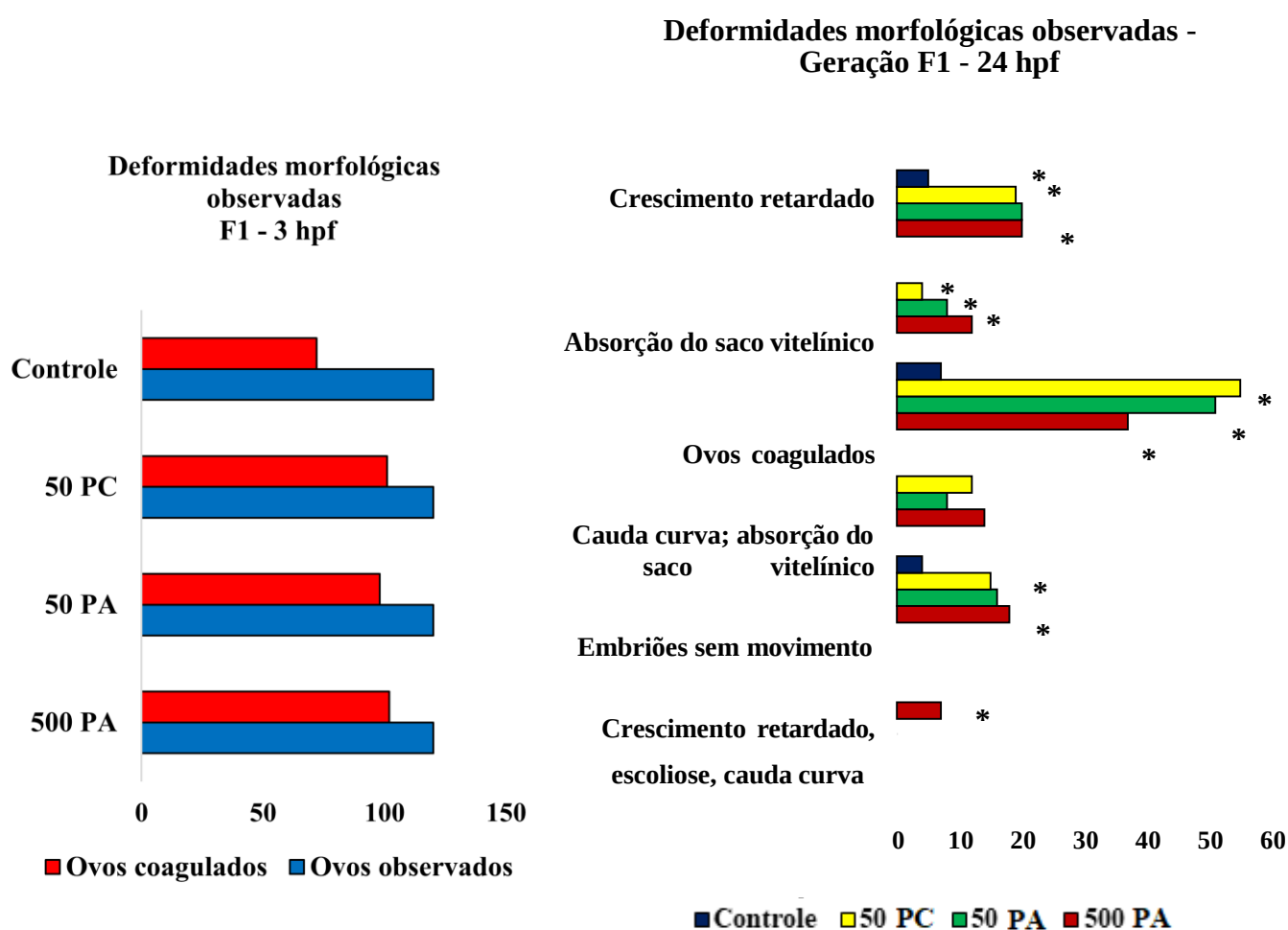
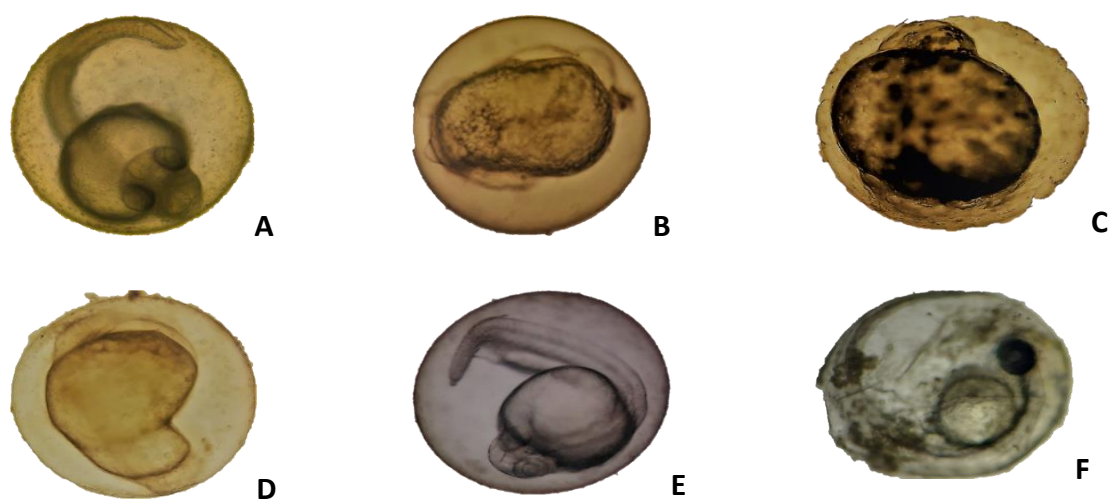


Figura 5. Deformidades encontradas aos 3 e 24 hpf (horas pós fertilização) nos embriões de *D. rerio* da geração F1 que foram submetidos aos corantes tartrazina, 50 mg.L⁻¹ PC, 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA e o controle.



A - Controle

B, C, D – Crescimento retardado: 50 mg.L⁻¹PC; 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA

E – Cauda curvada e deformação no saco vitelino: 500 mg.L⁻¹ PA

F – Embriões sem movimento: 500 mg.L⁻¹ PA

3.5.4. Análises químicas

A análise química do corante mostrou concentração acentuada de sódio, 63,6 mg.L⁻¹ PA, e 62,6 mg.L⁻¹ PC, com destaque também para as concentrações de Potássio> Fósforo> Ferro> Alumínio (Tabela 1). A quantidade de nitrogênio total em PC foi maior (29,75 mg L⁻¹) do que PA (24,8 mg L⁻¹), conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Análise química nominal de 500 mg.L⁻¹ dos corantes analítico (PA 100%) e comercial (PC 86%) e análise estatística do coeficiente de correlação de Spearman dos principais elementos químicos, componentes dos corantes, com o número de ovos e embriões de *D. rerio* (*p ≤ 0,05).

Parâmetros (mg L ⁻¹)	LQ	PA	PC	Parâmetros (mg L ⁻¹)	LQ	PA	PC
Alumínio	0.01	0.0160	0.0314	Níquel	0.01	<0.01	<0.01
Antimônio	0.005	< .005	< .005	Fósforo	0.01	0.46*	0.213*
Arsênico	0.01	<0.01	<0.01	Potássio	0.5	1.22*	1.084*
Bário	0.01	<0.01	<0.01	Selênio	0.01	0.008	0.008
Berílio	0.01	<0.01	<0.01	Silício	0.5	<0.5	<0.5
Bismuto	0.01	<0.01	<0.01	Prata	0.01	<0.01	<0.01
Boro	0.01	<0.01	<0.01	Sódio	0.5	63.6*	62.6*
Cádmio	0.001	<0.001	<0.001	Estrôncio	0.01	0.013	0.0124
Cálcio	0.5	<0.5	<0.5	Tálio	0.01	<0.01	<0.01
Cobalto	0.01	<0.01	<0.01	Estanho	0.01	<0.01	<0.01
Cobre	0.005	<0.005	<0.005	Titânio	0.01	<0.01	<0.01
Cromo	0.01	<0.01	<0.01	Urânio	0.01	<0.01	<0.01
Ferro	0.01	0.0710	0.05	Vanádio	0.01	<0.01	<0.01
Chumbo	0.01	<0.01	<0.01	Zinco	0.01	<0.01	<0.01
Lítio	0.01	<0.01	<0.01	Nitrato	15	<15	<15
Magnésio	0.5	<0.5	<0.5	Nitrito	0.5	<0.5	<0.5
Manganês	0.01	<0.01	<0.01	Nitrogênio Total	2.5	24.8	29.75
Molibdênio	0.01	<0.01	<0.01				

LQ – Limite de Quantificação

3.6. Discussão

A análise da capacidade reprodutiva de *D. rerio* em dois ensaios, geração F0 por 21 dias e de 11 meses da geração F1, refletiu o impacto do corante na fertilidade dos ovos da espécie.

Nas duas gerações (F0 e F1), em 0 hpf e em 24 hpf, houve correlação positiva entre o número de ovos e os elementos químicos fósforo, potássio, ferro e sódio. O fósforo é classificado como um macromineral que o organismo necessita em grandes quantidades pela sua função estrutural (McDowell, 1992); o ferro é disponibilizado principalmente através da alimentação (Barros et al., 2002) e destaca-se, essencialmente, por sua participação em processo respiratório celular (NRC, 1993). O sódio é importante na absorção de nutrientes no trato digestório e, juntamente com o potássio, é responsável pelo balanço iônico nos fluidos do corpo do animal (Aguiar, 2018).

Os *D. rerio* são bem conhecidos por sua capacidade de produzir grande quantidade de ovos (ABNT NBR 15499, 2015). As concentrações de 500 PA, na geração F0, e 50 PC na geração F1, apresentaram elevado número de ovos. Entretanto, nesta pesquisa, em ambas as gerações, até 24 hpf, o número de ovos viáveis das concentrações diminuíram. Apesar dessa tentativa evolutiva, o corante provou ser tóxico para os embriões.

Os diferentes períodos de exposições aos corantes também influenciaram o número de ovos. Na exposição de 21 dias aos corantes, houve um maior número de ovos na maior concentração, portanto pode ser verdade que os organismos respondam mais rapidamente a uma maior exposição de contaminantes, em um curto período.

Em uma exposição mais longa (onze meses), o número de ovos foi significativamente maior na concentração mais baixa do corante comercial padrão. Portanto, em longos períodos de exposição a contaminantes, os estímulos metabólicos às tentativas de adaptação podem ser maiores em concentrações mais baixas, corroborando a discussão e hipótese apresentadas acima.

Foram notadas algumas mudanças no comportamento do *D. rerio* na geração F1 exposta aos corantes. Em 500 PA foi observada natação lenta e também comportamento de alimentação de flocos precipitados no aquário. Na concentração de 50 PA e PC, os peixes apresentaram maior agitação. Esses comportamentos podem estar correlacionados com danos neurológicos causados por enzimas colinérgicas e alto metabolismo para desintoxicação (Chen et al. 2011; Andrade et al. 2016). Embora a presente pesquisa não tenha realizado análises enzimáticas, os comportamentos observados podem ser devido a esse comprometimento.

As deformidades encontradas em embriões em ambos os padrões de corantes e todas as concentrações refletiram ecotoxicidade para a geração F2. É necessário considerar que o fato das gerações F0 e F1 permanecerem nas referidas condições de exposição e os resultados da presente pesquisa demonstraram um efeito ecotoxicológico progressivo, inclusive efeito teratogênico sob a exposição contínua. Abe et al. (2018), estudaram dois corantes azo (Ery e NR51) que se mostraram tóxicos e pré-oxidantes para as fases embrionária e larval de *D. rerio*, alterando o desenvolvimento embrionário com danos ao consumo de energia, comportamento e sistema de toxificação, evidenciado por condição de estresse oxidativo dos embriões, corroborando com os dados da presente pesquisa.

Em termos de pureza, o corante amarelo tartrazina possui diversas composições que dificultam o entendimento de sua toxicidade. Segundo Resende, (2015), mesmo em corantes puros, não há como determinar seu grau de pureza, pois pode ser influenciado por contaminantes em seu processo de fabricação. Nesta pesquisa, o corante comercial 86% apresentou a mesma ecotoxicidade, que o corante analítico, na mesma concentração. Embora existam exceções e divergências entre diferentes autores, acredita-se que a fase embrionária seja mais resistente do que a fase de vida larval até a fase juvenil (Léonard et al. 2005) e embora o uso de embriões ainda seja controverso, devido às dúvidas sobre a permeabilidade do córion do embrião e seu papel como possível barreira a substâncias de alto peso molecular ou com alto potencial tóxico, esses fatores ainda não estão completamente esclarecidos.

No caso do corante amarelo tartrazina, observou-se que o corante passou pelo córion, resultando em deformação da gema e ausência de somito, e, devido ao rápido desenvolvimento observado em 24 hpf, pode-se concluir que os corantes estimularam o desenvolvimento embrionário. Em 48 hpf, os embriões já estavam na fase larval.

Linskens (2018) realizou testes com *D. rerio* expostos ao corante tartrazina na concentração de 22 μ M, para avaliar o aprendizado, flexibilidade cognitiva e memória de adultos, cujo estágio embrionário permaneceu exposto ao corante até 24 hpf e concluiu que essa exposição, mesmo sem exposição futura, afeta significativamente a capacidade de lembrar e ter flexibilidade cognitiva.

Portanto, a presente pesquisa, por meio da análise reprodutiva e morfológica, aponta a ecotoxicidade do corante tartrazina, desde sua menor concentração, corroborando com a indicação literária de que os corantes azo são potencialmente tóxicos.

3.7. Conclusões

Apesar de um grande número de ovos produzidos por *D. rerio* expostos a corantes amarelo tartrazina, a perda de viabilidade em 24 hpf demonstrou o efeito negativo desses corantes nas reproduções.

O corante influenciou negativamente o desenvolvimento dos peixes da geração F1, o que foi demonstrado pelo aumento da mortalidade e de deformidades durante o seu desenvolvimento.

O número de ovos produzidos na geração F1 foi maior que o número de ovos produzidos na geração F0, indicando a influência positiva do corante nesse aspecto da reprodução de *D. rerio*.

Os efeitos observados na análise morfológica dos embriões de *D. rerio*, nas concentrações do corante a 24 hpf, foram letais, tais como coagulação, deformações na gema e ausência de somito.

Os diferentes corantes amarelo tartrazina testados (padrão analítico 100% e padrão comercial 86%) têm os mesmos potenciais embriotóxicos na espécie de *D. rerio*.

Quanto aos aspectos de desenvolvimento morfológicos do embrião, o corante amarelo tartrazina apresentou toxicidade crônica, evidenciando seu potencial ecotoxicológico.

Com base nos resultados obtidos, a menor concentração do corante 50 mg.L⁻¹ já causou efeitos ecotoxicológicos. Portanto, as indústrias de alimentos devem rever seu emprego como aditivo.

Referências

- Abe, FR, Soares, AMVM, Oliveira, DP, Gravato, C. (2018). Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. *Environmental Pollution* 235, 255 e 262.
- ABNT NBR 15499:2015 Emenda 1:2016 (2016). (Projeto: emenda ABNT NBR 15499:2016). Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta. Rio de Janeiro. 2016.
- Aguiar, NC, (2018). Inclusão de cloreto de sódio (NaCl) na ração para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná. 57p.
- Andrade, TS, Henriques, JF, Almeida, AR, Machado, AL, Koba, O., Giang, PT, Soares, AMVM, Domingues, I. (2016). Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioral disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 170, 390 e 399.
- APHA – American Public Health Association, (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington:APHA. 1360 pp.
- Ayres, M, Ayres Junior, M, Ayres DL, Santos, AAS (2007). Bioestat 5.3:aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM.
- Barros, MM, Pezzato, LE, Kleemann, GK, Hisano, H., Rosa, GJM (2002). Níveis de Vitamina C e Ferro para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.6, p.2149-2156.
- Chen, TH, Wang, YH, Wu, YH (2011). Developmental exposures ethanol or dimethylsulfoxide allow concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish; implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquatic Toxicology*, V 102, p. 162-166.
- CODEX ALIMENTARIUS (2015). General Standard For Food Additives, Codex Stan 192-1995. Food and Agriculture Organization of The United States and World Health Organization.
- Dammski, AP, Muller, BR, Gaya, C., Regonato, D. (2011). Zebrafish-Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 20-1.
- Del Giovine, L., Bocca, AP (2013). Determination of synthetic dyes in ice cream by capillary electrophoresis. *Food Control*, v.14, p.131-135.
- DIRETIVA 2008/128/EC Parlamento Europeu. Disponível www.europarl.eu. Acesso: 07 março.2020.
- EPA US – United States Environmental Protection Agency. (1992). Method 3010A: Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts for Total Metals for Analysis by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FLAA) or Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICP), 1 st edn. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

EC - European Commission (1995). Commission Directiva 95/45/CE de 26 de Julho de 1995 which establishes the specific purity criteria of the dyes that can be used in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, L 226 de 22.9.1995.

EFSA - European Food Safety Authority (2009). Scientific Opinion on the reevaluation Tartrazine (E 102). EFSA Journal, v.7, (11):1331, p.1-52, 2009.

Evans, D.H.; Permarini, P.M.; Choe, K.P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, v.85, p.97-177.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United States. (2020). Chemical risks and JECFA (2015) Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>>. Acesso em: 7 março. 2020.

Gupta, R., Ranjan, S., Yadav, A., Verma, B., Malhotra, K., Madan, M., Chopra, O., Jain, S., Gupta, S., Joshi, A., Bhasin, C., & Mudgal, P. (2019). Toxic Effects of Food Colorants Erythrosine and Tartrazine on Zebrafish Embryo Development. *Current Research in Nutrition and Food Science* V.7 (3) 876-885pp.

Joshi, V, & Pancharatna, K, (2017). Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. *International Journal of Toxicology* 37(1): 38-44.

Léonard, M, Vanpoucke, M, Petiti-Poulsen, V, Porcher, JM (2005). Evaluation of the fish embryo test as a potential alternative to the standard acute fish toxicity test OECD 203.

Linskens, A. (2018). The Long Term Effects of Tartrazine (FD&C Yellow No. 5) on Learning, Cognitive Flexibility, and Memory of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos into Adulthood. Disponível em people.uwm.edu (acesso 7/3/2020).

Marmitt, S; Pirota, L. V.; Stülpe, S. (2010). Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 384-388, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n2/27.pdf>>. Acesso em: 02. Mar. 2018.

McDowell, L. R. (1992). *Minerals in Animal and Human Nutrition*, Academic Press: London.

Matsuo, H., Yokooji, T., Morita, H., Ooi, M., Urata, K., Ishii, K., Takahagi, S., Yanase, Y., Hiragun, T., Mihara, S., Hide, M. (2013). Aspirin Augments IgE-Mediated Histamine Release from Human Peripheral Basophils via Syk Kinase Activation. *Allergology International* 62:503-511.

Moraes, P.M., Loureiro, V. R., Padilha, P. M. (2009). Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 4, 923-927.

Moreira, SC (2019). Aspectos ecotoxicológicos do corante índigo sintético e natural – com organismos teste *D. rerio* e *R. subcapitata*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. 97p.

Motta, CM, Simoniello, P., Arena, C., Capriello, T., Panzuto, R., Vitale, E., Agnisola, C., Tizzano, M., Avallone, B., Ferrandino, I. (2019). Effects of four food dyes on development of three model species, *Cucumis sativus*, *Artemia salina* and *Danio rerio*: Assessment of potential risk for the environment. *Environmental Pollution* 253:1126 e 1135.

National Research Council (1993). Nutrient Requirements of fish. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/2115>.

OECD (2013). Draft guidance document on the threshold approach for acute fish toxicity 1 testing. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Paris: OECD Publishing 2013.

OECD (2012). Organisation for Economic Co-Operation and Development. Test No. 229: Fish short term reproduction assay. Paris: OECD 2012.

Ostroski, I.; Bariccatti, R. A.; Lindino, C. A. (2005). Estabilidade dos corantes Tartrazina e Amarelo Crepúsculo. *Acta Sci. Technol.*, v. 27, n. 2, p. 101 – 106, 2005.

Polônio, MLT, & Peres, F. (2009). Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira *Cad. Saúde Pública* vol.25 no.8 Rio de Janeiro.

Prado, MA, Godoy, HT, (2003). Corantes artificiais em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.14, n.2, p.237-50 eDisponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/see>>.

Resende, MR, (2015). Mutagenicidade do corante alimentício tartrazina no ensaio *salmonella*/microsoma. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Tecnologia. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Tecnologia.118p. 2015.

Sleiman, M; Vildoso, D; Ferronato, C; Chovelon, J. Photocatalytic degradation of azo dye Metanil Yellow: Optimization and kinetic modeling using a chemometric approach. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 77, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

Tacon, A. G. J. (1990). Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. The Essential Nutrients, Argent Laboratories Press: Washington, vol. 1.

West, I., Gulley, D., (1996). Software Toxstat 3.5. Wyoming. USA. University of Wyoming.

Capítulo 4: Ecotoxicidade do corante amarelo tartrazina em larvas de *Danio rerio* após exposição multigeracional

Resumo

O corante amarelo tartrazina, utilizado em diversos segmentos industriais, se destaca na indústria alimentícia como aditivo para potencializar a cor em alimentos. Pesquisas toxicológicas têm demonstrado reações carcinogênicas, mutagênicas e de hipersensibilidade em cobaias e humanos. Entretanto, há uma escassez de dados ecotoxicológicos e não há legislação nacional e internacional que forneça valores de exposição seguros para proteção da vida aquática. Portanto, no presente estudo, visando entender a ecotoxicidade do corante amarelo tartrazina ao peixe *Danio rerio*, a fim de se verificar a adaptabilidade da espécie ou a eventual toxicidade progressiva, foram utilizadas larvas da geração F2 após a exposição das gerações parentais e das larvas da geração F1 a dois padrões de corantes utilizados pela indústria alimentícia: um padrão analítico (PA 100% - concentrações de 50 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹) e outro padrão comercial (concentração de PC 86% - 50 mg.L⁻¹). A geração F0 foi exposta, por 21 dias, às concentrações dos corantes supracitadas. Foi mantido um controle apenas com água de cultivo. A reprodução de F0 resultou na geração F1, que, aos onze meses de idade, por meio de testes de acasalamento, originou a geração F2. Foram avaliados os parâmetros tempo de eclosão dos ovos e morfologia das larvas. As análises de larvas foram realizadas em 48, 72 e 96 hpf (horas pós fertilização). As análises morfológicas mostraram deformidades subletais, indicando ecotoxicidade crônica para a espécie *D. rerio* em várias gerações expostas por longo período ao corante analítico e comercial amarelo tartrazina.

Palavras-chave: Corante azo, reprodução, deformidades larvais, teratogenia.

4.1. Introdução

4.1.1. Aspectos químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos do corante amarelo tartrazina

O corante amarelo tartrazina é um corante azo utilizado como aditivo pelas indústrias alimentícias devido à sua alta solubilidade em água, durabilidade e múltiplas cores que agrega aos produtos. Outras aplicações industriais são na indústria farmacêutica, cosmética, de papel, couro, têxtil e outras indústrias que usam cores.

É preparado pela diazotização do ácido 4-amino-benzeno com ácido nítrico e nitrito de sódio. Em seguida, o composto diazo é acoplado com ácido 4,5-di-hidro-5-oxi-1- (4-sulfofenil) -1H-pirazol-3-carboxílico ou éster metílico, éster etílico ou um sal de ácido carboxílico, que é isolado e purificado como sal de sódio ou cálcio (FDA 21 CFR74.705). Como principais componentes incolores, pode-se encontrar em sua composição o cloreto de sódio e / ou sulfato de sódio.

O aditivo foi relacionado a uma série de inconvenientes para a saúde humana, incluindo imunotoxicidade, citotoxicidade (Axon, et al., 2012; Freitas, 2012), mutagenicidade (Khayyat et al., 2017) e neurotoxicidade (Arderm & Ram, 2001; Mohamed et al, 2015).

A legislação, considerando a toxicologia clássica, determina que a faixa de concentração permitida considerando a ingestão de alimentos humanos é de 0,005 g / 100 mL a 0,05 g / 100 mL dependendo da massa corporal (JECFA). Os riscos associados ao consumo de aditivos alimentares são determinados por um comitê científico internacional, o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), que orienta a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) da Organização Mundial da Saúde (OMS), composta por 51 países, membros de ambas as organizações, sobre o uso de corantes alimentares.

No entanto, o modo de exposição por ingestão em humanos difere das vias de absorção quando tal molécula é introduzida no ambiente aquático. A literatura relata que esse corante chega diariamente aos corpos d'água por meio do lançamento de efluentes de diferentes segmentos industriais, representando um risco ecotoxicológico para a biota aquática. Estima-se que 15% dos corantes usados mundialmente se perdem durante o processo industrial, sendo lançados no meio ambiente, afetando principalmente corpos d'água (Meireles, 2013). Substâncias químicas, como corantes, não são completamente fixadas aos produtos, sejam eles quais forem (Oller et al., 2010).

Portanto, supõe-se que há uma alta concentração deles nos efluentes. Este problema raramente é abordado na literatura, e não há limites de exposição seguros para a proteção da vida aquática na legislação nacional e internacional em vigor.

Os tratamentos convencionais de efluentes não são eficazes na remoção da cor (Ventura-Camargo e Marin-Morales, 2013), o que afeta diretamente a capacidade de fotossíntese do ambiente aquático, reduzindo ou impedindo a penetração da luz. Essas moléculas são estáveis e reativas com sistemas biológicos, o que pode desencadear efeitos adversos de curto, médio ou longo prazo.

Ventura-Camargo e Marin-Morales (2013) realizaram uma revisão bibliográfica sobre azo corantes em efluentes e concluíram que é a classe que mais prejudica o meio aquático devido à sua alta persistência e sua composição contendo anéis aromáticos. São altamente resistentes à degradação natural e podem causar citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade em diferentes organismos expostos a tais componentes.

Diante do exposto, esta pesquisa baseia-se nas concentrações de tartrazina existentes na legislação de aditivos alimentares para produtos de consumo humano para entender os aspectos ecotoxicológicos no meio aquático utilizando-se larvas de *D. rerio* como organismo teste e pretende responder às seguintes questões: 1) os diferentes corantes amarelo tartrazina (puro e comercial) têm efeitos ecotoxicológicos em gerações expostas de *D. rerio*? 2) Ao expor várias gerações de *D. rerio* a diferentes padrões do corante amarelo tartrazina, existe uma capacidade adaptativa ou os aspectos ecotoxicológicos são contínuos? 3) O *endpoint* “sobrevivência” é suficiente para atestar ecotoxicidade na exposição de várias gerações de *D. rerio* a diferentes tipos de corante tartrazina em diferentes concentrações? 4) O *endpoint* morfologia das larvas de *D. rerio* da geração F2 de pais e avós expostos a esses corantes é um biomarcador eficiente para detectar a ecotoxicidade do corante? 5) A concentração mínima permitida para ingestão humana pode ser considerada segura para exposição em ambientes aquáticos com base em dados morfológicos de larvas de *D. rerio*?

4.2. Desenho experimental

4.2.1. Teste de toxicidade crônica com *D. rerio*

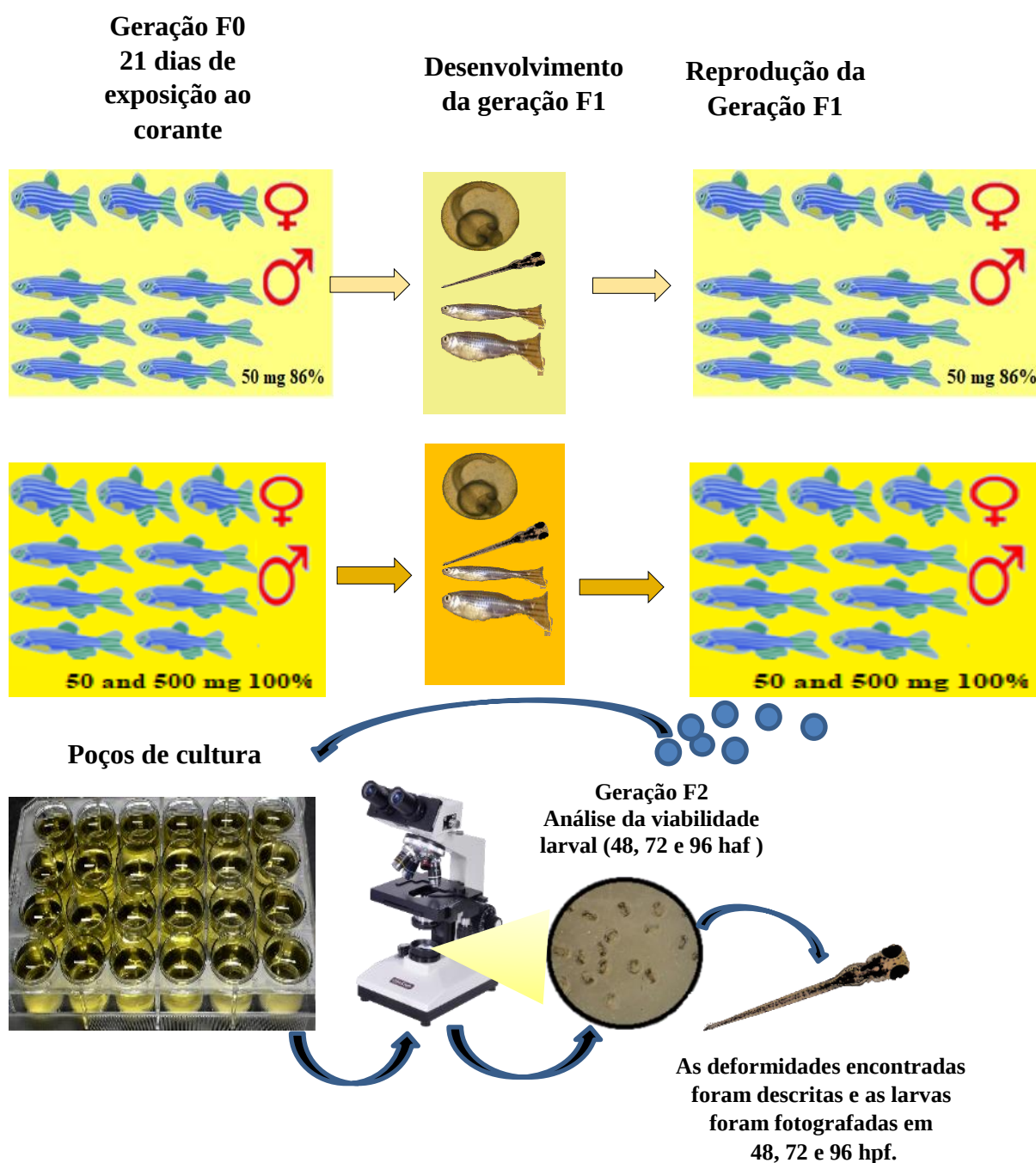
Adultos de *D. rerio* foram colocados em aquários de 2 L com água desclorada tratada com filtro de carvão ativado em pó. As variáveis dureza e pH foram ajustadas para 44 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $7,5 \pm 0,5$, respectivamente. A temperatura permaneceu em $26^\circ \text{C} (\pm 1)$ e o fotoperíodo foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (OECD, 2012). Após o período de adaptação, foram realizados testes de sensibilidade do lote com NaCl (ABNT NBR 15499/2015).

Os testes ecotoxicológicos (geração F0, F1 e F2) foram realizados nas concentrações de 500 mg.L^{-1} e 50 mg.L^{-1} para o corante tartrazina padrão 100% analítico Dynatech e 50 mg.L^{-1} do corante comercial 86% - Sigma Aldrich. O controle experimental foi realizado com água reconstituída (água de cultivo). Na geração F0, adultos de *D. rerio* com aproximadamente cinco meses de idade, foi mantida por 21 dias em cada condição experimental citada acima. Nove fêmeas e dezoito machos para cada condição. Durante os testes, os peixes receberam ração comercial de Tetramim (97% de proteína bruta) duas vezes ao dia. No décimo quinto dia, eles foram alimentados diariamente, duas vezes ao dia, com nauplios de *Artemias salinas* comprada comercialmente. Após o período de teste, a reprodução foi realizada em triplicata no 22º dia na proporção de uma fêmea para dois machos (ABNT NBR 15499/2015) escolhidos ao acaso, para cada condição experimental.

Os ovos resultantes do acasalamento da geração parental (geração F0) foram tratados com 250 μL de NaClO^{-1} por período de 0 e 24 (hpf) horas pós fertilização para evitar contaminação por fungos. Eles continuaram expostos nos mesmos padrões e nas mesmas concentrações de origem. As fases embrionárias, larvais, juvenis e adultas foram monitoradas. Aos onze meses de idade da geração F1, dezoito machos e nove fêmeas foram selecionados de cada condição experimental para os testes de reprodução, mantendo uma proporção de dois machos para fêmea em cada aquário. Os ovos obtidos nesta reprodução (geração F2) continuaram expostos às mesmas condições experimentais de origem.

Foram avaliados os tempos de eclosão e a morfologia da larva. Após a eclosão, cento e vinte larvas foram selecionadas aleatoriamente de cada condição e enviadas para teste de análise morfológica qualitativa. Essas larvas foram alocadas em poços de cultura celular em uma placa com vinte e quatro poços de 2,0 cm de profundidade x 1,5 cm de diâmetro. Em cada poço foram colocadas cinco larvas, totalizando 120 larvas para cada condição experimental. As observações foram feitas em microscópio óptico (Leica Application Suite - DM 3000 LED) a 48, 72 e 96 hpf (horas pós fertilização). Quando foram encontradas anomalias, as larvas foram fotografadas em aumentos de 1000 vezes, a 500 μ m. As anomalias morfológicas detectadas foram descritas de acordo com OECD, 236 (2013); Nagel (2002); SCHOLZ et al., (2008); Beekhuijzen et al. (2015) (Figura 1).

Figura 1. Desenho experimental da metodologia utilizada para análise das larvas (F2) descendentes da reprodução da geração F0 sob a influência dos corantes amarelo tartrazina nas concentrações de 50 PC, 50 PA e 500 PA e controle.



4.3. Análise química do corante tartrazina

A curva de calibração foi traçada usando o comprimento de onda de 427 nm da tartrazina (Nº Fisqp Dynac 006 -Dynatch 2016) na resolução de 0,01 do espectrofotômetro UV-1800, 12:12h fotoperíodo. A concentração de 16 g.L⁻¹ como solução estoque foi preparada para o padrão comercial 86% e a concentração de 10 g.L⁻¹ foi preparada como solução estoque para o padrão analítico 100% e a partir destas, soluções de 0; 1;5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg L⁻¹ foram preparadas para manter uma relação linear entre as variáveis e avaliar a relação entre o grau de pureza da substância e sua degradação e em períodos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h, foram removidos aliquotas do corante para medir o pH, oxigênio dissolvido e a condutividade.

A determinação dos metais dos corantes padrão analítico (PA) e padrão comercial (PC) foi feita por espectrometria de emissão de plasma: método de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) de acordo com o método 3120B (APHA 2012). As amostras foram preparadas de acordo com EPA US 3010A (1992). Seguindo as recomendações dos Métodos Padrão (APHA 2012) as concentrações de nitrogênio total usando o método 4500 A, nitrato usando o método 4110 B e nitrito usando o método 4500 B.

4.4. Análises estatísticas

O número total de larvas de *D. rerio* obtidas nas gerações F1 e F2, encontradas em cada condição estudada, foi submetido ao teste de normalidade Shapiro-Wilk seguindo a análise multivariada de Bartlett. Quando necessário, os dados foram transformados em raiz quadrada e, se comprovada normalização e homogeneidade, eram realizados os testes estatísticos ANOVA e testes múltiplos de Tukey; caso contrário, o teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis (método de Dunn) foi realizado. Nas análises de correlação entre os elementos químicos dos corantes com o número de larvas de *D. rerio*, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados das imagens com deformidades de larvas foram analisados pelo teste de Fisher. Foram usados os softwares estatísticos BioEstat 5.3 (Ayres, 2007) e Toxstat 3.5 (West Inc. & Gulley, 1996).

4.5. Resultados

4.5.1. Degradação do corante amarelo tartrazina

O corante não degradou dentro do período de 96 h demonstrando estabilidade da molécula a partir das análises de pH dos corantes PC 86% (Figura 2, Tabela 1) e PA 100% (Figura 3, Tabela 2). O pH permaneceu dentro da faixa de 7,2 – 7,7 atribuindo caráter básico a solução, e através das curvas de calibração dos corantes com PC 86% de equação: $y = 0,0356x - 0,0115$, com coeficiente de determinação $R^2=0,09994$ (Figura 2) e PA 100% de equação: $y = 0,0626x - 4E-05$ com coeficiente de determinação $R^2=0,09998$ (Figura 3).

A relação entre pH e degradação do corante tartrazina foi estudada, sendo que o processo de degradação do corante depende primordialmente do pH da solução. Em pH mais ácidos, a degradação é acelerada por um mecanismo de redução do corante e posterior clivagem. (Ostroski et al., 2005). Sendo assim a estabilidade do corante neste caso foi confirmada, não só pela grande estabilidade da molécula (Marmitt et al., 2010; Sleiman et al., 2007), mas também pela continuidade do pH na faixa de 7,0, não resultando em uma solução ácida, o que favoreceu a não degradação do corante.

O oxigênio dissolvido permaneceu maior que $3,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e a condutividade ficou abaixo de 7 mS. A tartrazina possui alta solubilidade em meio aquoso, devido à presença de cromóforos, grupos carboxílicos, nitro, hidroxí e amino que são capazes de aumentar os intensidade de absorção do corante (Del Giovine e Bocca 2003), portanto de difícil descoloração.

Figura 1. Curva de calibração da degradação do corante amarelo tartrazina PC 86%, a partir da concentração de 16 g.L⁻¹

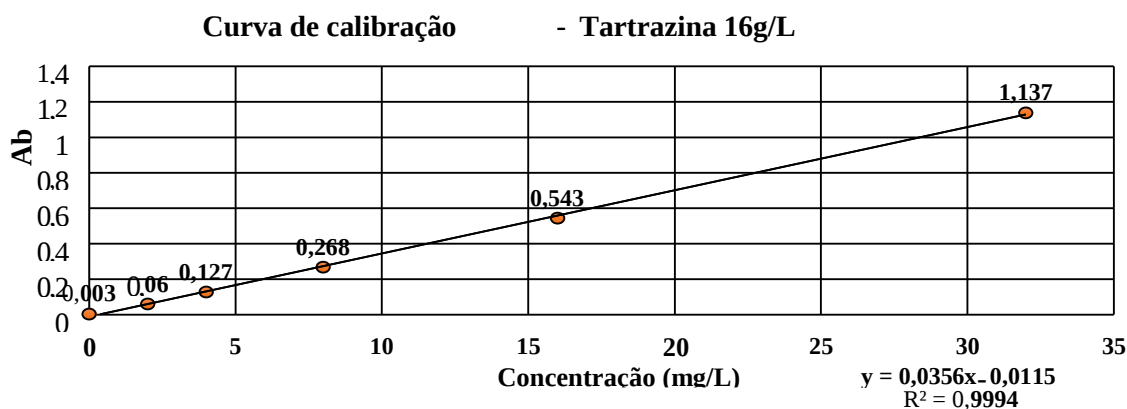


Tabela 1. Análises de pH e concentração nos diferentes tempos (PC 86%)

	Início		6 h		12 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
	pH	7.7	pH	7.5	pH	7.5	pH	7.4	pH	7.4	pH	7.3	pH	7.3
Controle	Conc.		Conc.		Conc.		Conc.		Conc.		Conc.		Conc.	
Amostra 1	32.28	7.6	33.42	7.4	33.34	7.4	33.35	7.4	33.81	7.3	34.05	7.3	34.24	7.2
Amostra 2	32.38	7.5	33.73	7.4	33.63	7.4	33.39	7.4	33.85	7.4	33.22	7.4	34.36	7.3
Amostra 3	32.61	7.5	33.71	7.4	33.80	7.4	33.63	7.4	33.80	7.4	34.05	7.4	34.44	7.3

Conc = máxima concentração (mg.L⁻¹)

Figura 2. Curva de calibração da degradação do corante amarelo tartrazina PA 100%, a partir da concentração de 10 g.L⁻¹

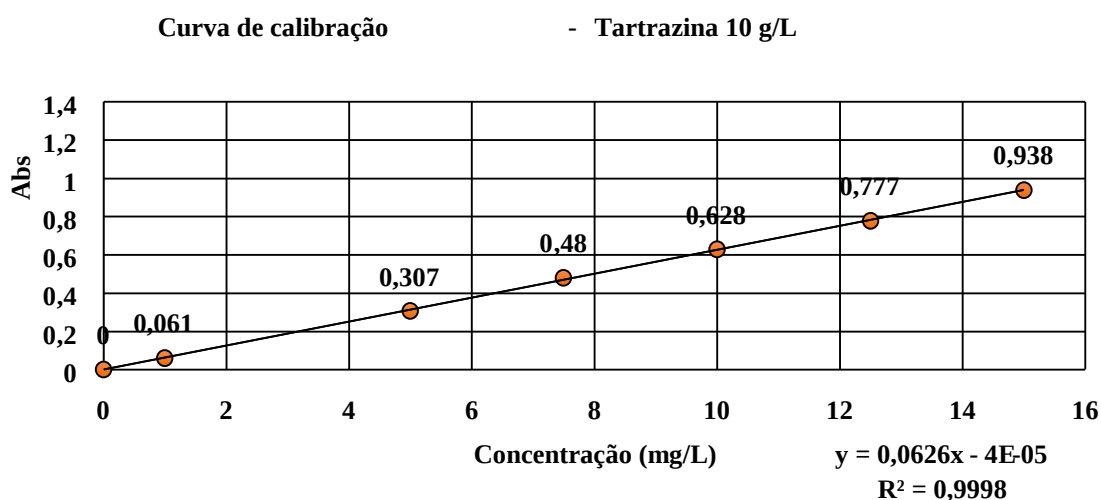


Tabela 2. Análises de pH e concentração nos diferentes tempos (PA 100%)

	Início	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	pH 7.6	pH 7.7	pH 7.5	pH 7.4	pH 7.3	pH 7.3	pH 7.3
	Conc. pH	Conc. pH	Conc. pH	Conc. pH	Conc. pH	Conc. pH	Conc. pH
Amostra 1	32.03 – 7.6	32.69 – 7.6	32.57 – 7.5	32.65 – 7.7	33.72 – 7.3	32.66 – 7.2	32.49 – 7.2
Amostra 2	32.03 – 7.6	32.69 – 7.6	32.57 – 7.5	32.65 – 7.7	32.72 – 7.3	32.66 – 7.2	32.49 – 7.2
Amostra 3	32.06 – 7.6	32.54 – 7.5	32.59 – 7.5	32.5 – 7.5	32.34 – 7.3	32.42 – 7.3	32.54 – 7.3

4.5.2. Reproduções dos testes de toxicidade de *D. rerio*

4.5.2.1. Geração F0

As médias do número de larvas nas concentrações 50 PC, 50 PA e 500 PA foram (379 ± 55); (344 ± 24) e (373 ± 59), respectivamente. A sobrevivência das larvas nessas concentrações foi superior a 80% de 48 hpf a 72 hpf. No entanto, em sete dias de observação, as porcentagens diminuiram para 26%, 32% e 38% nas concentrações de 500 PA 50 PA e 50 PC, respectivamente. No controle, a sobrevivência após sete dias foi de 44% (Tabela 3).

Tabela 3. Médias do número de larvas (F1) por concentração obtidas nas reproduções da geração F0 do peixe *D. rerio* expostos às concentrações de 50 mg.L⁻¹ PC; 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA e o controle.

Média do número de ovos, embriões e larvas (n=3), das reproduções da geração F0				
Hpf	Geração F1			
	Controle	50 PC	50 PA	500PA
0	313 ± 11	549 ± 53	540 ± 54*	636 ± 63*
24	295 ± 8	466 ± 32	430 ± 39	487 ± 66
48	276 ± 8	379 ± 54	344 ± 24	373 ± 58
72	258 ± 8	311 ± 51	281 ± 20	301 ± 102
96	197±40	232±6	162±50	103±7
Após sete dias (larvas)	122 ± 27	145 ± 12	112 ± 11	98 ± 5

± Desvio padrão

* ≤ 0.05

4.5.2.2. Desenvolvimento da geração F1 exposta ao corante

A geração F1 foi mantida em concentrações de corante desde os ovos até a reprodução dos adultos aos onze meses de idade. Os peixes expostos às concentrações mencionadas tiveram um desenvolvimento lento. Até os três meses, muitos morreram e foram observadas deformidades subletais como entorses na coluna, que refletem na dificuldade para nadar, deformidades nos olhos, que prejudicavam a alimentação dos peixes e deformidades no corpo. Aos três meses de idade, os peixes nas concentrações, se comparados ao controle, eram 60% menores em comprimento e peso. Aos onze meses, três reproduções foram realizadas em triplicata (Tabela 4).

Tabela 4. Médias das larvas (geração F2) das reproduções da geração F1 de peixes *D. rerio* submetidos às concentrações de 50 mg.L⁻¹ PC, 50 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ PA do corante amarelo tartrazina e controle a 48, 72, 96 hpf (horas pós fertilização) e número de larvas após sete dias.

Média dos números de Ovos, Embriões e Larvas das reproduções da geração F1				
Geração F2				
hpf	Controle	50 PC	50 PA	500 PA
0	358 ± 99	1.065 ± 95*	609 ± 91	497 ± 94
24	195 ± 72	835 ± 75*	367 ± 57.33	238 ± 115
48	118±	472±268*	231±93	25±10*
72	98±85	202±144*	67±14	2±0
96	86±75	79±41	14±5	-
Após sete dias	75±8	7±0	6±2	-

± Desvio padrão

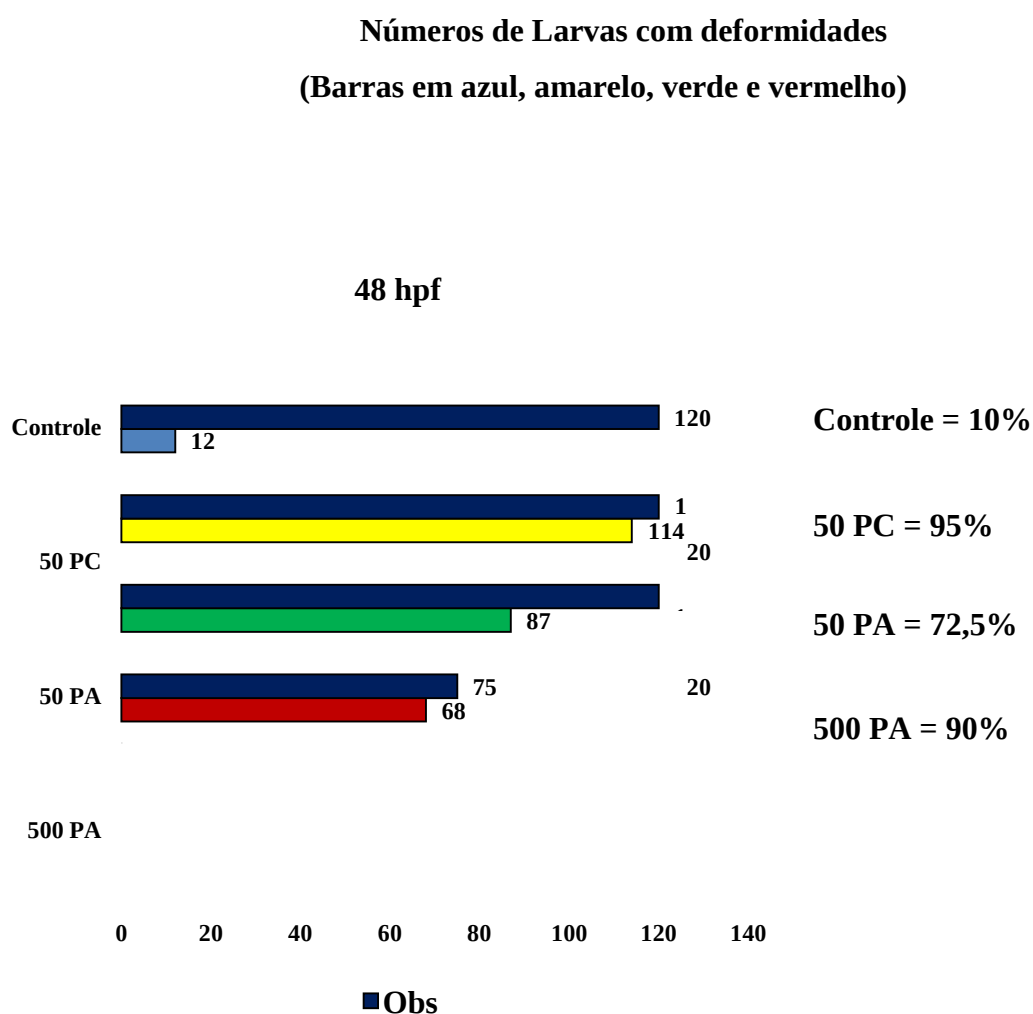
* ≤ 0.05

4.5.2.3. Deformidades morfológicas em larvas da geração F2 (48, 72 e 96 hpf)

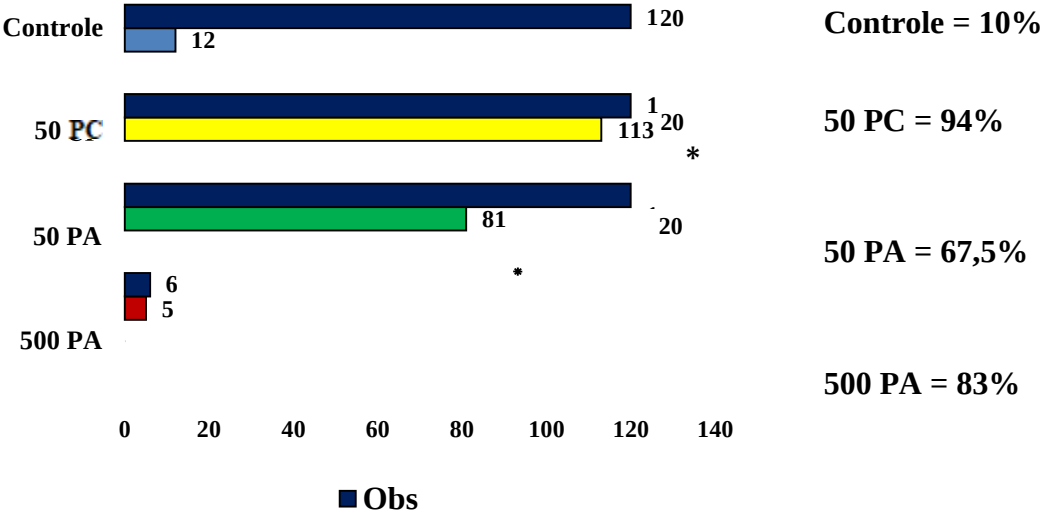
Os parâmetros físico e químicos foram monitorados para cada poço de observação (Tabela 5).

As larvas do controle eclodiram em 72 hpf e nas concentrações, as 48 hpf. No controle, das 120 larvas observadas em cada período, de 9% a 10% apresentaram deformidades. Em 50 PC, as larvas observadas em 48, 72 e 96 hpf, apresentavam deformidades de 80% a 95%. Na concentração de 50 PA, mais de 67% apresentaram deformidades de 48 hpf a 96 hpf. Na concentração de 500 PA, em 48 hpf, 90% apresentaram deformidades, em 72 hpf, 83% e em 96 hpf não houve larvas sobreviventes (Figura 4, 5 e 6).

Figura 4. Número total de larvas com deformidades observadas e percentuais de deformidades para cada observação do controle e concentrações de 50 mg.L⁻¹ PC; 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA e as análises estatísticas exato de Fisher * $\leq 0,05$)



72 hpf



96 hpf

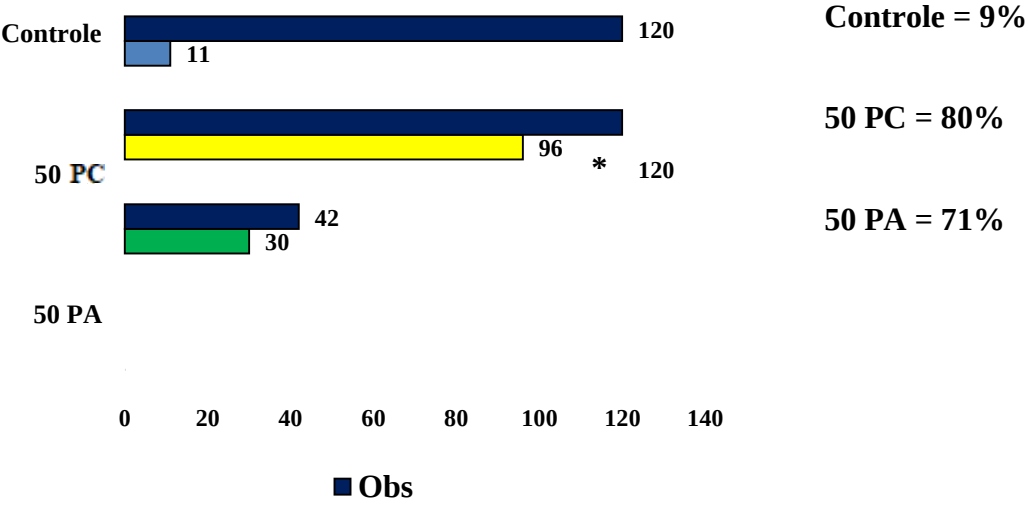
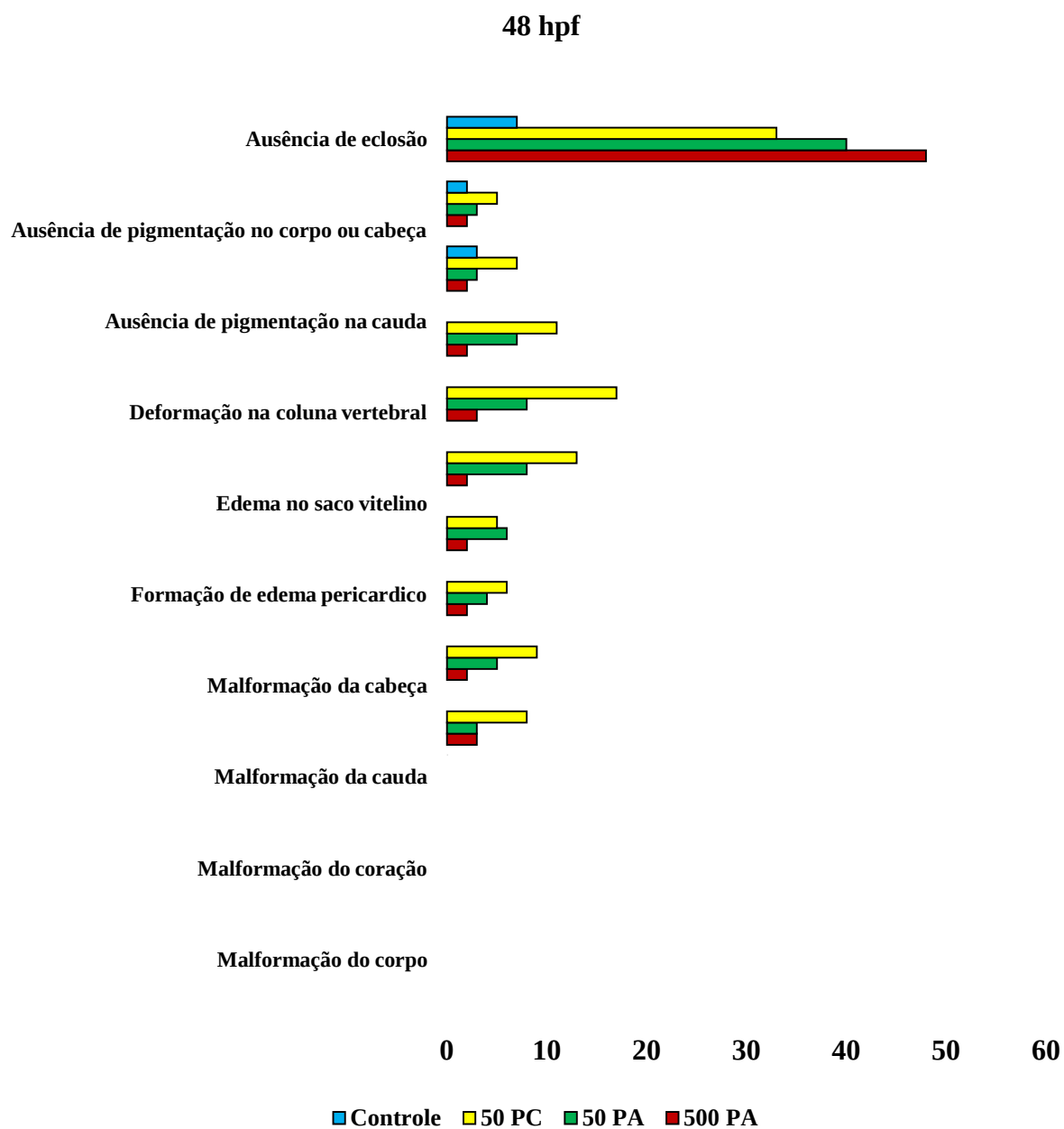
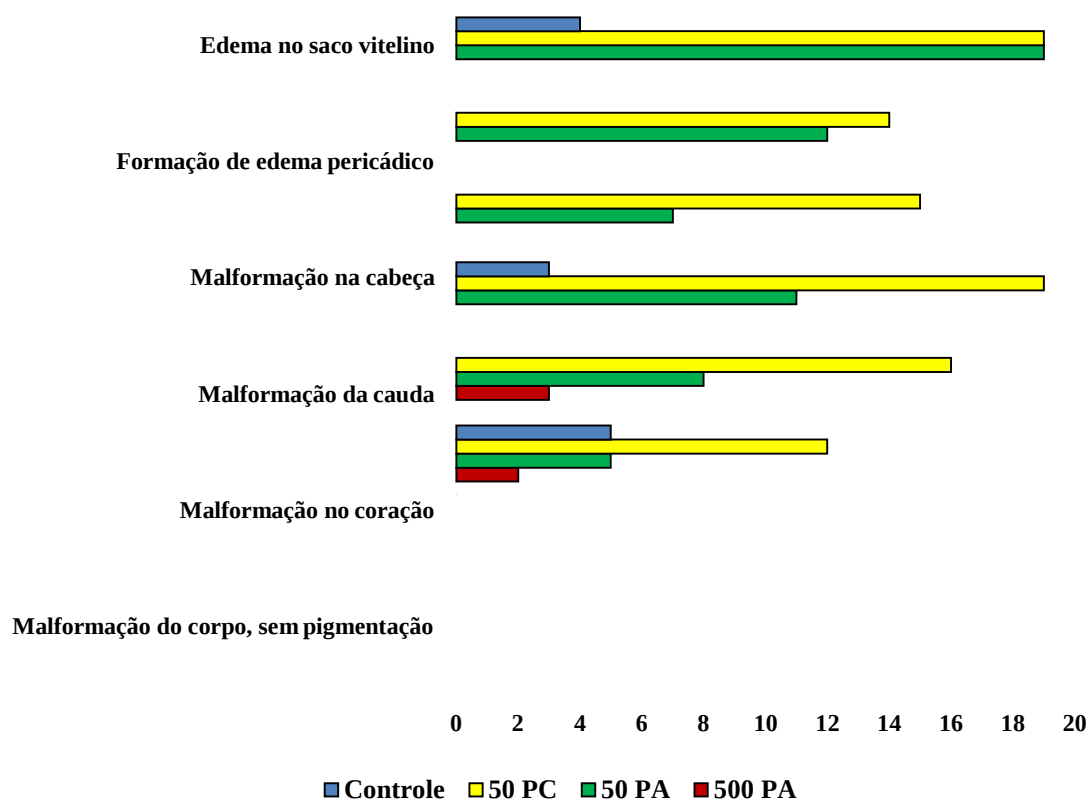


Figura 5. Principais deformidades observadas nas larvas (48 a 96 horas pós fertilização) nas concentrações de 50 mg.L⁻¹ PC, 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA.



72 hpf



96 hpf

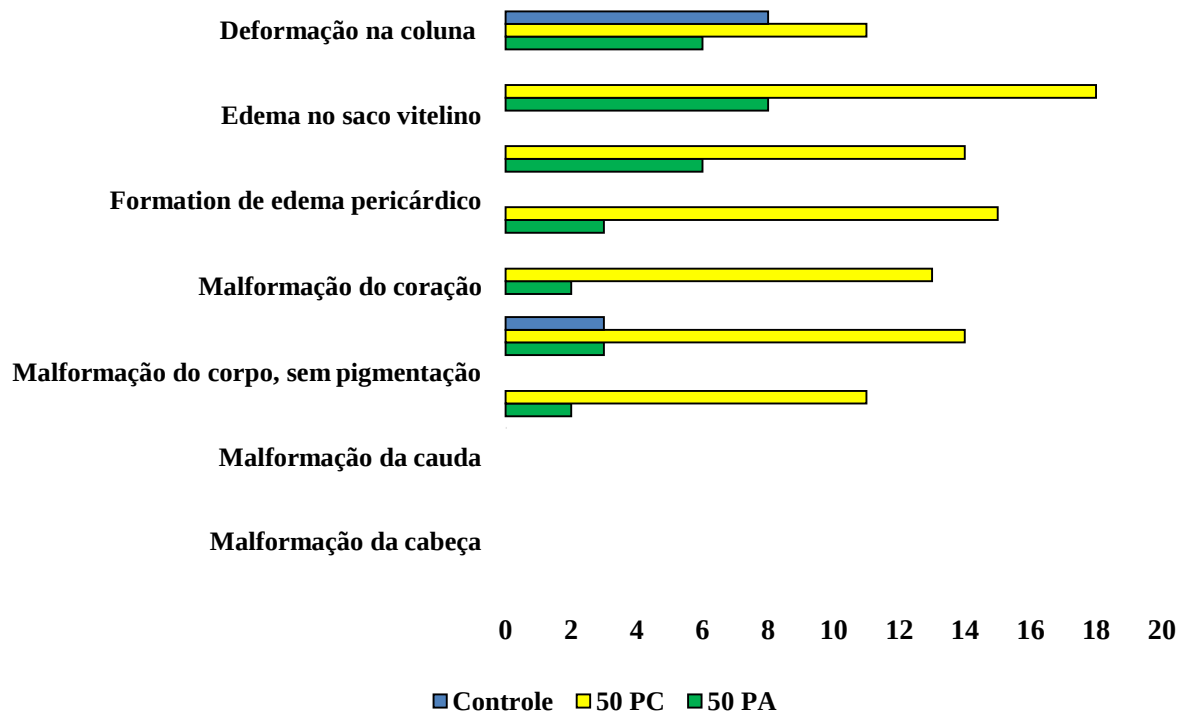


Figura 6. Fotos das larvas de *D. rerio* com deformidades em 48, 72 e 96 hpf (horas pós fertilização) no controle e nas concentrações de 50 mg.L⁻¹ PC, 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA.

Fotos



Foto: Controle

Descrição

Desenvolvimento normal
Embrião com movimentos
normais e com pigmentação

Endpoints

48 hpf - **Controle**



Foto: 500 PA

Malformação do corpo
Movimentos da cauda
comprometidos, pigmentação do
corpo e cauda difuso.

48 hpf - **50 PC; 50
PA; 500 PA**

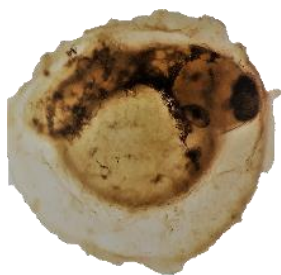


Foto: 500 PA

Malformação do corpo, cabeça, cauda e formação de edema.

48 hpf – **50 PC, 50 PA**
e 500 PA



Foto: 50 PA

Formação de edema; malformação da cauda, cauda torcida, sem pigmentação

48 hpf - **50 PC; 50 PA**
500 PA



Foto: 500 PA

Deformação no corpo, cabeça, Desenvolvimento anormal

48 hpf - **500 PA**



Foto: 500 PA

Deformação generalizada do corpo

48 hpf - **500 PA**



Foto: 500 PA

Deformação generalizada do corpo

48 hpf – **500 PA**

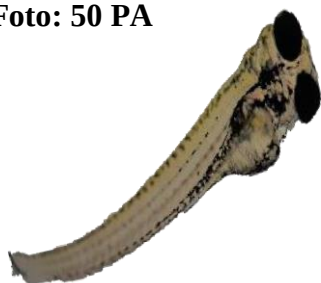
**Controle**

Desenvolvimento normal

72 hpf – **Controle****Foto: 50 PA**

Torção da cauda
 Malformação da cabeça,
 comprometendo a região pericárdica e
 causando entorse no início da
 formação da cauda.

72 hpf - **Controle, 50
 PA, 50 PC**

**Foto: 50 PA**

Malformação da cabeça e região
 pericárdica, com formação de edema;
 malformação da cauda.

72 hpf - **50 PC e 50 PA****Foto: 50 PA**

Edema do saco vitelino

72 hpf - **50 PC e 50 PA.**



Foto: 500 PA

Malformação do corpo (edema do saco vitelino). Deformação da coluna (distorção da cauda) ausência de cabeça

72 hpf - **500 PA**



Foto: 50 PC

Malformação do corpo (edema do saco vitelino). Deformação da coluna (distorção da cauda) e Malformação da cabeça

72 hpf - **50 CS e 50 PA**



Foto: 50 PA

Deformação do corpo (edema do saco vitelino), edema no pericárdico.

72 hpf - **50 CS, 50 PA, 500 PA**



Foto: 50 PA

Malformação da cabeça e olhos. Formação de edema pericárdico. Ausência de pigmentação no corpo, cabeça e cauda.

72 hpf - **50 PC, 50 PA**

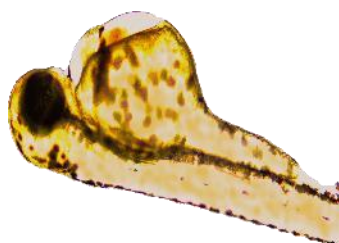
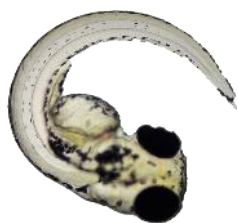


Foto: 500 PA

Malformação da cabeça; formação de edema pericárdico.

72 hpf - **500 PA**



Ausência de pigmentação no corpo e na cabeça. Deformação na cauda

72 hpf - **50 PC; 50 e 500 PA**

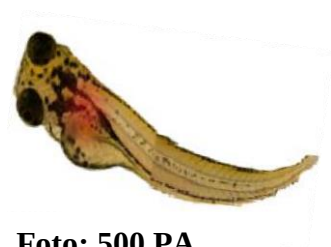
Foto: 500 PA



Edema pericárdico com malformação no coração (batidas irregulares), ausência de pigmentação no corpo e cabeça.

72 hpf - **500 PA**

Foto: 500 PA



Edema pericárdico com vazamento de fluidos do coração.

72 hpf – **500 PA**

Foto: 500 PA



Região pericárdica aberta por todo o corpo da larva.

72 hpf - **500 PA**

Foto: 500 PA



Deformação generalizada

96 hpf – **500 PA**

Foto: 50 PA



Foto: 50 PA

Malformação da cabeça, deformação da coluna vertebral e falta de pigmentação no corpo e cauda

96 pf – 50 PC; 50 PA

4.6. Caracterização química do corante

A análise química do corante detectou alumínio, ferro, fósforo, potássio e estrôncio em maiores quantidades, superados pelos elementos sódio e nitrogênio (Tabela 6). Nenhum dos elementos químicos apresentou correlação com o número total de larvas de 48, 72 e 96 hpf (horas pós fertilização).

Tabela 6. Análise química nominal das concentrações dos corantes padrão analítico (PA 100%) e padrão comercial (PC 86%).

Parâmetros (mg.L ⁻¹)	LQ	PA	PC	Parâmetros (mg.L ⁻¹)	LQ	PA	PC
Alumínio	0.01	0.0160	0.0314	Níquel	0.01	<0.01	<0.01
Antimônio	0.005	<0.005	<0.005	Fósforo	0.01	0.460	0.213
Arsênico	0.01	<0.01	<0.01	Potássio	0.5	1.22	1.084
Bário	0.01	<0.01	<0.01	Selênio	0.01	0.008	0.008
Berílio	0.01	<0.01	<0.01	Silício	0.5	<0.5	<0.5
Bismuto	0.01	<0.01	<0.01	Prata	0.01	<0.01	<0.01
Boro	0.01	<0.01	<0.01	Sódio	0.5	63.6	62.6
Cádmio	0.001	<0.001	<0.001	Estrôncio	0.01	0.0134	0.0124
Cálcio	0.5	<0.5	<0.5	Tálio	0.01	<0.01	<0.01
Cobalto	0.01	<0.01	<0.01	Estanho	0.01	<0.01	<0.01
Cobre	0.005	<0.005	<0.005	Titânio	0.01	<0.01	<0.01
Cromo	0.01	<0.01	<0.01	Urânio	0.01	<0.01	<0.01
Ferro	0.01	0.0710	0.0522	Vanádio	0.01	<0.01	<0.01

Chumbo	0.01	<0.01	<0.01	Zinco	0.01	<0.01	<0.01
Lítio	0.01	<0.01	<0.01	Nitrato	15	<15	<15
Magnésio	0.5	<0.5	<0.5	Nitrito	0.5	<0.5	<0.5
Manganês	0.01	<0.01	<0.01	Nitrogênio	2.5	24.8	29.75
Total							
Molibdênio	0.01	<0.01	<0.01				

LQ – Limite de Quantificação = menor quantidade necessária para a análise química do corante.

4.7. Discussão

A análise das alterações morfológicas crônicas das larvas de *D. rerio* da geração F2, cujas gerações anteriores foram expostas a um teste de vinte e um dias (F0) e onze meses (F1), demonstram a vulnerabilidade do risco ecotoxicológico a que a biota aquática está sujeita se o corante for liberado sem tratamento nesses ecossistemas nas concentrações analisadas. Os corantes podem persistir por longos períodos em organismos aquáticos, principalmente os azocorantes, reconhecidos por sua solubilidade em água devido a presença de grupos sulfônicos ($-\text{SO}_3\text{H}$) que conferem ao corante um caráter ácido, tornando-o facilmente ionizável (Zollinger, 1991). Sua composição possui elevado número de compostos nitrogenados, reconhecidos por causar eutrofização em rios e a sua remoção dos efluentes ainda carece de tecnologia adequada. A ausência de legislação específica sobre a quantidade de corante que um efluente industrial pode conter também dificulta articulações mais assertivas sobre seu uso e tratamento desses efluentes.

Os azocorantes são precursores de metabólitos tóxicos e / ou mutagênicos (Leme et al., 2015). No entanto, a descrição da ecotoxicidade para organismos aquáticos é escassa.

No caso do corante alimentar amarelo tartrazina, não há dados sobre a concentração que as indústrias alimentícias lançam nos efluentes durante os processos de fabricação de seus produtos. Há grande dificuldade em verificar se a quantidade de aditivos utilizada pela indústria de alimentos está de acordo com a legislação vigente e seu grau de pureza (Polônio e Peres, 2009).

O corante possui diversos padrões de pureza e aplicações no mercado (JECFA, 2006), porém seu controle de qualidade não é conhecido. Eles podem estar contaminados com aminas aromáticas e metais pesados (EFSA, 2009). A legislação não obriga as indústrias a descreverem a composição do corante nos rótulos dos produtos.

Segundo Resende (2015), há necessidade de harmonização das legislações entre os países, evidenciando quais são as impurezas que podem fazer parte da composição de um corante e seus limites máximos permitidos, para que exista um consenso em seu uso. No Brasil é obrigatório apenas a declaração integral de que o produto contém o corante amarelo tartrazina (ANVISA, 1999).

No presente estudo, ambas as concentrações testadas para um padrão 100% puro e menor concentração testada para o padrão comercial com 86% de pureza revelaram ecotoxicidade nos parâmetros sobrevivência, desenvolvimento da geração F1 e deformidades da geração F2. A maior ecotoxicidade foi observada na concentração mais alta do padrão analítico; entre os testes a 50 mg.L⁻¹ (padrões comerciais e analíticos), o efeito adverso da concentração comercial foi maior para a espécie *D. rerio*.

As deformidades observadas nas larvas da geração F2 padrão comercial foram iguais às deformidades encontradas nas larvas expostas ao padrão analítico na mesma concentração (50 mg.L⁻¹). A sobrevivência das larvas aos 48 hpf até sete dias de observação nas gerações F0 e F1, em comparação com o controle, também expressou toxicidade.

Comparando as contagens das larvas obtidas pela reprodução da geração P com as contagens de larvas obtidas pelas reproduções da geração F1, a permanência dos peixes nos corantes intensificou a toxicidade, tornando-se letal para a perpetuação da espécie. Na maior concentração (500 PA) para a geração F1, houve um efeito agudo na sobrevivência das larvas. As larvas não sobreviveram a 96 hpf.

As deformidades observadas no desenvolvimento das larvas da geração F2 padrão comercial foram iguais às deformidades encontradas nas larvas expostas ao padrão analítico na mesma concentração (50 PA). A sobrevivência das larvas a 48 hpf até sete dias de observação nas gerações F1 e F2, em comparação com o controle, também expressou ecotoxicidade.

As anomalias em componentes celulares detectadas em larvas F2 expostas em todas as concentrações e em ambos os padrões do corante resultaram principalmente em edema. O edema no saco vitelino foi uma das deformações morfológicas mais comuns, seguido pelo edema do pericárdio, embora o edema possa ocorrer em qualquer órgão ou parte do corpo do peixe (Huang et al., 2014), a frequência com que ocorrem pode estar associada a ambientes estressantes, qualidade inadequada da água ou pode ser causada pela ecotoxicidade nas gerações anteriores (Barrionuevo & Burggren, 1999).

O aparecimento de edema pericárdico é melhor explicado pela disfunção cardíaca, indicativa de uma disfunção osmótica ou metabólica associada ao vazamento de vasos endoteliais (Ali et. al., 2014) ou mesmo uma disfunção renal, pois os rins atuam no equilíbrio da água corporal (Coelho, 2004). Tais mudanças corroboram as obtidas por Joshi & Pancharatna (2017), que analisaram a fase embriolarval de *D. rerio* expostos ao corante tartrazina desde a fase de gastrulação (5,25 hpf) até sete dias de desenvolvimento em várias concentrações do corante. Os autores observaram que a 20-30 mM (10,68 - 16 g), o corante causou anormalidades como doenças cardíacas; em exposições superiores a 30 mM, foi observada bradicardia seguida de alterações nos batimentos cardíacos, distorções da cauda e edema no saco vitelino; em níveis extremamente altos (26 – 53 g), o desenvolvimento cessou, levando os peixes à morte.

As deformações na coluna, nesse estudo, foram anomalias comuns em todas as concentrações. Essas deformações geralmente estão associadas ao equilíbrio de íons como cálcio e fósforo ou à redução da miosina (Cheng et al., 2000), principal componente proteico dos miofilamentos, organelas que compõem o esqueleto das células musculares. Alterações no esqueleto axial durante o desenvolvimento embrionário de *D. rerio* também podem estar associadas a um ambiente de estresse e qualidade da água (OECD, 1998).

As deformações na coluna dificultam a locomoção e sobrevivência das larvas, pois a coluna vertebral está relacionada ao comportamento alimentar e à procura de refúgios. Mudanças na locomoção estão correlacionadas com danos neurológicos mediados por enzimas colinérgicas e custos metabólicos envolvidos nos processos de desintoxicação (Andrade et al., 2015). As larvas mostraram alterações nas atividades de natação, nas concentrações de 50 PC e PA houve maior atividade no nado dos peixes e na concentração mais elevada (500 PA), houve menor atividade em relação ao controle.

O corante tartrazina também estimulou a eclosão das larvas a 48 hpf em ambos os corantes e em todas as concentrações. Essas observações foram suficientes para detectar a ecotoxicidade dos corantes. Isso também foi relatado por Motta et al. (2019), que observaram mais de 60% de eclosões aos 48 hpf em reproduções com *D. rerio* seguidos de 20% de deformidades sob o efeito do mesmo corante nas concentrações de 1,2 g.L⁻¹. Gupta et al., (2019) observaram taxas de eclosão em 55% dos embriões em 0,5% de tartrazina em 8mL de água, com inibição do desenvolvimento da bexiga natatória e desenvolvimento de outras deformidades corporais, como a curvatura cauda a 72 hpf. As exposições após 120 hpf levaram ao desenvolvimento de outras alterações, como edema cardíaco.

Os embriões detectam sinais físicos e químicos e ativam a produção da enzima corionase, que inicia a degradação da camada interna do córion e estimula os movimentos para que ocorra o fenômeno de eclosão. Produtos químicos podem acelerar ou atrasar o processo de eclosão (Fuiman, 2002).

Lancaster e Lawrence (1989, 1991 e 1999), em estudos de análise do corante comercial tartrazina, afirmaram que os níveis de contaminantes como a benzidina e a anilina diminuíram consideravelmente ao longo da década, para um melhor grau de pureza. No entanto, ainda existe a possibilidade de algumas impurezas de síntese (Prival et al., 1988, Resende, 2015) desencadearem substâncias tóxicas potenciais.

O corante amarelo tartrazina é objeto de muitos estudos e discussões polêmicas sobre sua toxicidade. Portanto, é importante considerar os processos de fabricação; contaminações, atividades mutagênicas e outros de caráter ecotoxicológico podem estar diretamente relacionados ao controle de qualidade das indústrias durante a síntese dos corantes e a possibilidade de contaminações por impurezas (Resende, 2015).

Testes ecotoxicológicos são importantes para estabelecer limites permissíveis de poluentes no meio aquático para a proteção da biota. Esses estudos são exigidos por diversas normas legais. Nos corpos hídricos brasileiros, a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº. 357/05 prevê os limites máximos permitidos de acordo com a classificação dos corpos d'água. Um dos usos refere-se à proteção da vida aquática descrita para rios de classes 1 e 2 (BRASIL, 2005). A legislação ainda não prevê limites mínimos de exposição segura para a proteção da vida aquática com base em corantes. Nesse sentido, a presente pesquisa destaca que, com base em ensaios multigeracionais e análises morfológicas de larvas de *D. rerio*, os dois corantes tartrazina utilizados, comercial - 86% e analítico - 100%, apresentaram ecotoxicidade, desde a menor concentração (50 mg.L⁻¹).

4.8. Conclusões

O estudo ecotoxicológico inédito de multigerações de *D. rerio*, expostos aos corantes amarelo tartrazina, com base na análise da reprodução e do desenvolvimento da geração F1, permanentemente expostos, seguido da análise do desenvolvimento larval F2 em três períodos distintos, revelou ecotoxicidade para a espécie.

Embora o corante tenha estimulado a reprodução do peixe, resultando maior número de maior número de larvas em relação ao controle, essas larvas não apresentaram viabilidade ao longo do tempo. Houve um declínio populacional maior que 50% na geração F1 e maior que 80% na geração F2.

O corante tartrazina é tóxico para o desenvolvimento de duas gerações expostas; na geração F1, ocorreram deformidades subletais e atraso no desenvolvimento; na geração F2, ocorreram deformidades larvais e números insuficientes de larvas para futuras reproduções.

As anomalias mais frequentemente observadas nas larvas de *D. rerio* foram edema de saco vitelino e pericárdio relacionado à presença do corante.

Os *endpoints* morfológicos das larvas mostraram-se adequados para esclarecimento sobre a ecotoxicidade do corante.

Referências

- ABNT NBR 15499 (2015) Amendment 1: 2016 Project: amendment ABNT NBR 15499:2016. Aquatic ecotoxicology – Short-term chronic toxicity. Rio de Janeiro.
- ABNT NBR 15088 (2016) Aquatic toxicology – Acute toxicity – Test method with fish (Cyprinidae), which revises the ABNT NBR 15088:2011 standard, prepared by the Spatial Study Commission for Ecotoxicological Analysis (ABNT/CEE-106)
- Ali S, Aalders J and Richardson MK (2014) Teratological effects of a panel of sixty water-soluble toxicants on zebrafish development. *Zebrafish* 11(129-141).
- Amin KA, Hameid II A, Elsttar AHA (2010) Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology* 48(10):2994–2999.
- Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, Giang, PT, Soares AMVM, Domingues I (2016) Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol* 170:390-399.
- Arden KD, Ram FS (2001). Tartrazine excusionfor allergic asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4:CD000460.
- APHA – American Public Health Association, (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington:APHA. 1360 pp.
- Axon A, May FEB, Gaughan LE, Williams FM, Peter G, Blain PG, Matthew C, Wright MC (2012) Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. *Toxicology* 298(40– 51).
- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AAS, (2007) Bioestat 5.3 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM.
- Barrionuevo WR.and Burggren WW (2020) O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient. Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu at CAPES-UNESP (186.217.144.058) on March 9.
- Beekhuijzen M, De Koning C, Flores-Guillén ME, De Vriesbuitenweg S, Tobor-Kaplon M, Van DE Waart B, Emmeh H, (2015) From cutting edge to guideline: a first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, 56:(64-76).
- BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.382 e n.388 de 5 de agosto (1999) Disponível:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/content>> Acesso 5 fev. 2020.
- BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.782, de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. Informe Técnico nº. 30, de 24 de julho (2007) Disponível em: <<http://www.portalanvisa.gov.br/> / acesso em: 25 de fevereiro de 2020.

Cheng SH, Wai AWK, So CH and Wu RSS (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environmental toxicology and chemistry* 19(12):3024-303.

Coelho EB (2004) Mecanismos de formação de edemas. *Revista Medicina Ribeirão Preto* 37:189-187.

CONAMA. Resolução No. 357 (2005) It provides for the classification of bodies of water and environmental guidelines for their classification, as well as establishing the conditions and standards for the discharge of effluents, and other measures. Brasil 27 p.

EPA US – United States Environmental Protection Agency. (1992). Method 3010A: Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts for Total Metals for Analysis by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FLAA) or Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICP), 1 st edn. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

European Commission – EC (1995) Commission Directiva 95/45/CE of July 26, 1995, which establishes specific purity criteria for dyes that can be used in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L 226 of 9.22.1995.

European Food Safety Authority - EFSA (2009) Scientific Opinion on the reevaluation Tartrazine (E 102). *EFSA Journal* 7(11):1331 (1-52).

Food And Drug Administration – FDA (1985) FD&C Yellow No. 5 final rule, removal of stay. *Federal Register* 50:35774-35783.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United States (2015) Chemical risks and JECFA. Disponível: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-dvice/jecfa/en/>> Accessed 7 March 2020.

Freitas AS. 2012. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Tecnológica*, Vol. 7, Nº 2 (2012), 65 – 72.

Fuiman LA (2002) Special considerations of fish eggs and larvae. In: L.A. Fuiman & R.G. Werner (Eds) *Fishery science: the unique contributions of early life stages* (1-32) Londres (UK): Blackwell Science.

Gupta R, Ranjan S, Yadav A, Verma B, Malhotra K, Madan M, Chopra O, Jain S, Gupta S, Joshi A, Bhasin C, and Mudgal, P (2019) Toxic Effects of Food Colorants Erythrosine and Tartrazine on Zebrafish Embryo Development. *Current Research in Nutrition and Food Science* Vol. 07, No. (3) 2019, Pg. 876-885.

Huang SY, Feng CW, Hung HC, Chakraborty C, Chen CH, Chen WF, Jean YH, Wang HD, Sung CS, Sun YM, Wu CY, Liu W, Hasiao CD, Wen ZH (2014) A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan induced abdominal edema. *Plos one* 9(1-11).

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA (2004) 63rd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Aluminium Lakes of Colouring Matters, General Specifications. WHO Food additives series, Geneva.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA (2006) Evaluation of certain food contaminants (Sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) WHO Technical Report Series 930.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA (2012) Laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) n° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. COMMISSION REGULATION (EU) No 231/2012 of 9 March 2012. Official Journal of the European Union, L 83/1 22.3.2012.

Joshi V and Pancharatna K (2017) Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. International Journal of Toxicology 37(1):38-44.

Khayyat L, Essawy A, Sorour J, Soffar A (2017) Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects *in vivo*. PeerJ 5:3041-3055.

Lancaster FE and Lawrence JF (1989) Determination of total non-sulphonated aromatic amines in the food colour amaranth by dithionite reduction followed by derivatization and high-performance liquid chromatography. Food Additives and Contaminants 6:415-423.

Lancaster FE and Lawrence JF (1991) Determination of total non-sulphonated aromatic amines in tartrazine, sunset yellow FCF and allura red by reduction and derivatization followed by high-performance liquid chromatography. Food Additives and Contaminants 8(3):249-264.

Lancaster FE and Lawrence JF (1999) Determination of benzidine in the food colours tartrazine and sunset yellow FCF, by reduction and derivatization followed by high-performance liquid chromatography. Food Additives and Contaminants 16(9):381-90.

Leme DM, Oliveira GAR, Meireles G, Brito LB, Rodrigues LB, Palma OD (2015) Eco-and genotoxicological assessments of two reactive textile dyes. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 78(5):287-300.

Marmitt, S; Pirotta, L. V.; Stülpe, S. (2010). Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. Química Nova, v. 33, n. 2, p. 384-388, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n2/27.pdf>>. Acesso em: 02. Mar. 2018

Meireles G, (2013) Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15. Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Mohamed AA, Galal AAA, Elewa YHA (2015) Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. Acta Histochem 117(7): 649-658.

Motta CM, Simoniello P, Arena C, Capriello T, Panzuto R, Vitale E, Agnisola C, Tizzano M, Avallone B, Ferrandino I (2019) Effects of four food dyes on development of three model species, *Cucumis sativus*, *Artemia salina* and *Danio rerio*: Assessment of potential risk for the environment. *Environmental Pollution* 253:1126 e 1135

Nagel R, DarT (2002) The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Biology, Medicine. Altex*, 19 Suppl (1):28-48.

Oba ET, Marino WS and Santos LRB (2009) Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável (226-247). In: Tavares-Dias M. (Ed.), *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá, Macapá.

OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development (1998) Recommendation concerning Effective Action against Hard Core Cartels.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development (2010) Draft guidance document on the threshold approach for acute fish toxicity 1 testing. Project 2.23, 2 Paris 4.

OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development (2012) Test No. 229: Fish short term reproduction assay Paris.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development (2013) Draft guidance document on the threshold approach for acute fish toxicity 1 testing. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test Paris.

Oller I, Malato S, Sánchez-Pérez JA (2010) Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination – A Review. *Science of the Total Environment* 26.

Ostroski, I.; Bariccatti, R. A.; Lindino, C. A. (2005). Estabilidade dos corantes Tartrazina e Amarelo Crepúsculo. *Acta Sci. Technol.*, v. 27, n. 2, p. 101 – 106, 2005.

Polônio MLT and Peres F (2009) Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira *Cad. Saúde Pública* 25(8) Rio de Janeiro.

Prival, MJ, Davis, V. M.; Peiperl, M.D.; Sandra J.; Bell, S.J. 1988. Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, v. 206, p. 247-259.

Resende MR (2015) Mutagenicidade do corante alimentício tartrazina no ensaio *salmonella*/microsoma. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Tecnologia. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Tecnologia 118p.

Scholz S, Fischer S, Gundel UE, Kuster ET, Luckenbach T, Voelker D, (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment -applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 15:394-404.

Sleiman, M; Vildoso, D; Ferronato, C; Chovelon, J. Photocatalytic degradation of azo dye Metanil Yellow: Optimization and kinetic modeling using a chemometric approach. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 77, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

Ventura-Camargo BC, and Marin-Morales MA (2013) Azo dyes; characterization and toxicity – a review. *Textiles and light industrial Science and technology* 2(2)85-103.

West. Inc.; Gulley D, (1996) Software Toxstat 3.5. Wyoming. USA. University of Wyoming.
Zollinger H, (1991) Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments WHILEY – VCH 3:492.

Capítulo 5. Histopatologia quali-quantitativa de gônadas femininas e masculinas em *Danio rerio* submetidos à ensaios crônicos com o azocorante alimentar amarelo tartrazina.

Resumo

Os azocorantes são um grupo de corantes bastante utilizados em diversos setores industriais, inclusive no setor alimentar, onde é extensivamente utilizado devido às cores brilhantes que adiciona aos alimentos; no entanto muitas pesquisas comprovam variados efeitos adversos aos organismos, incluindo mutagenicidade, citogenicidade e genotoxicidade. Pesquisas toxicológicas no setor de alimentos estão mais concentradas em seu consumo na população humana e poucas pesquisas para a análise do impacto do corante no ambiente. Esta pesquisa utilizou o peixe *Danio rerio* para responder se concentrações dos corantes permitidas para o uso em alimentos, poderá causar danos a biota aquática. A pesquisa foi realizada submetendo-se os peixes a ensaios crônicos de vinte e um dias, em concentrações de 50 mg.L⁻¹ em dois padrões de corantes, um padrão comercial (PC) e outro puro absoluto (PA), e em concentrações de 500 mg.L⁻¹ para o corante padrão puro. As gônadas femininas apresentaram predominância de vitelogênese completa avançada e alterações morfológicas de 14% a 26% em todas as concentrações, e nas concentrações 50 PA e 500 PA, apresentaram oócitos atrésicos. Nas gônadas masculinas observou-se regiões de degeneração gonadal em todas as concentrações e ausência de espermatocistos nas concentrações de 50 PC e 500 PA. Nas concentrações 50 PA e 500 PA foram encontradas alterações nas células de Sertoli e nas células de Leyding. As alterações nas gônadas das concentrações foram de 15% a 30%. O número médio de ovos nas reproduções foram significativos; a média na concentração de 500 PA foi de (636 ± 63), ultrapassando mais de 100% a média do controle (313 ± 11), no entanto, o número de larvas viáveis no controle foi de 40% de larvas viáveis e nas concentrações de 50 PC, 50 PA e 500 PA foram de 26%, 21% e 15%, respectivamente.

Palavras-chave: Histologia, reproduções, oócitos, peixe, legislações, degradação.

5.1. Introdução

O corante alimentar amarelo tartrazina é um dos principais azocorantes utilizados pelas indústrias de alimento como aditivo. Com propriedades altamente favoráveis como estabilidade, durabilidade e solubilidade na água, o corante pode ser facilmente aplicado puro ou com outros corantes em muitos produtos alimentares, como também em cosméticos e medicamentos. Desde 1950, as indústrias de alimentos usam cores sintéticas nos alimentos, atualmente, estima-se que mais de 15 milhões de quilos de corantes sejam utilizados nas indústrias de alimentos. Seu uso é puramente de valor econômico e tecnológico, a adição é intencional com fins organolépticos em suas fases de fabricação, elaboração e preparação.

A avaliação dos aditivos em alimentos é baseada no controle da IDA (Ingestão Diária Aceitável), desenvolvida pelo JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives. O valor da IDA para o corante é de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ por peso corporal.

Diversos estudos apontam reações adversas dos aditivos aos organismos, quer seja aguda ou crônica, tais como reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, de alterações no comportamento em geral e carcinogenicidade. Essas substâncias alteram o "turnover" das células durante o seu crescimento normal ou no processo de hiperplasia regenerativa, contribuindo para a incidência de câncer (Sugimura, 1982). Estudos o relatam como carcinogênico (Ghonimi and Elbaz, 2015); citotóxicos (Amin et al., 2010; Mpountoukas et al., 2010); genotóxicos (Soares et al., 2015; Khayyat et al., 2017). Atualmente, estudos moleculares procuram descrever melhor suas alterações a nível celular (Basu and Kumar, 2016 a,b). Alterações histológicas foram detectadas nos rins de camundongos (El-sakhawy et. al., 2019) e em sangue de ratos, seguidos de comportamento locomotor alterado na prole (Albasher et al., 2020).

A síntese da tartrazina pode gerar até 10% de impurezas, algumas dessas, o 4-aminobifenil, 4-aminoazobenzeno e a benzidina, um composto que apresenta alta toxicidade aguda por ingestão produzindo cianose, cefaleia, confusão mental, náusea e vertigem. A exposição dérmica pode causar erupções cutâneas e irritação. Vários estudos ocupacionais relatam associação entre a exposição de trabalhadores a benzidina e câncer urinário, roedores expostos por via oral apresentaram câncer da glândula mamária e fígado (IARC, 2017).

Considerando-se que durante a produção do corante, ou de processos industriais que se utilizam dele, há uma perda significativa do princípio ativo e de seus subprodutos que são adicionados aos efluentes, e que podem atingir os corpos de água, os organismos aquáticos estão susceptíveis e devem ser avaliados quanto aos potenciais efeitos ecotoxicológicos.

Nesse contexto, em organismos aquáticos, poucas pesquisas ecotoxicológicas com embriões e larvas de *D. rerio* foram realizadas (Joshi & Pancharatna, 2017; Linskens, 2018; Gupta et al., 2019, Jiang et al., 2019; Silva & Fracácio, 2020, no prelo) demonstrando acentuadas deformidades no desenvolvimento da espécie submetidas à tartrazina alimentar.

Embora muitas vezes não se verifique efeitos na sobrevivência, crescimento, reprodução e morfologia externa, num dado tempo de exposição, ao serem analisados os biomarcadores citológicos, histológicos, fisiológicos e bioquímicos, observam-se alterações que a longo prazo, podem comprometer as funções vitais do organismo e da viabilidade da espécie. Nesse contexto, destacam-se os peixes, por serem organismos topo de cadeia alimentar, recebendo impacto diretamente da água e ou por biomagnificação.

5.1.1. Biomarcadores histológicos

A histologia é uma ferramenta útil para diagnosticar efeitos agudos e crônicos de agentes químicos em peixes (Akaishi *et al.* 2004). Os biomarcadores histológicos permitem visualizar os efeitos da exposição a vários agentes biológicos e químicos, sendo considerada importante ferramenta na avaliação de alterações patológicas em peixes em curto e médio prazo dependendo, portanto, da concentração de contaminante e do tempo de exposição, permitindo uma abordagem relativamente fácil de identificação de possíveis alterações em diversos tecidos e órgão de peixes principalmente brânquias, fígado, rim, gônadas e pele (Bernet *et al.*, 1999).

Os peixes estão no último nível trófico da cadeia alimentar e são organismos sensíveis ao impacto de produtos químicos em ecossistemas aquáticos, metabolizando e acumulando xenobióticos ao longo do tempo e espaço (Domingues et al., 2010). A saúde dos peixes depende do ambiente no qual estão localizados e podem ser utilizados como bioindicadores de estresse.

O *D. rerio* é amplamente utilizado como modelo para detectar poluentes ambientais devido a sua alta fecundidade em ambiente favorável, seu ciclo de desova se repete a cada 5-7 dias; com rápido ciclo de reprodução; alta sensibilidade às substâncias químicas (Hill et al., 2005, Aleström et al., 2006 , Dai et al., 2014); dimorfismo sexual externo; alta taxa de fecundidade influenciada pelos fatores ambientais e/ou sazonais. A fêmea pode colocar de 200-300 ovos por desova (ABNT NBR 15499/2015), os machos liberam os espermatozoides logo após a desova. Os embriões atingem a maturidade sexual entre três e seis meses (Armiliato 2015), além disso é um modelo consolidado em estudos toxicológicos científicos, devido à sua adaptação às diferentes condições ambientais (Knie e Lopes, 2004).

Apresenta grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos, por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos órgãos (Costache et al., 2005), principalmente os ovários dos peixes podem ser alvos diretos ou indiretos de poluentes (Willey e Krone, 2001) comprometendo o processo reprodutivo da espécie. Há escassez de conhecimentos fisiológicos e não há pesquisas histológicas de peixes com o corante amarelo tartrazina ou com os azocorantes.

Corantes alimentares chegam às águas superficiais através das perdas nos processos produtivos de alimentos. A principal preocupação é a ineficiência na degradação do corante para grandes volumes industriais. O corante é também utilizado comercialmente em processos de manufaturas de alimentos, e, na maioria dos casos, não existe tratamento para esse tipo de perdas do corante.

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo responder aos seguintes questionamentos: 1) O corante amarelo tartrazina, utilizado como aditivo nas indústrias de alimentos pode ser prejudicial à biota aquática se lançado sem tratamento em corpos hídricos? 2) O estudo histológico nas gônadas femininas e masculinas de *D. rerio* podem determinar eficazmente toxicidade do corante, e há relação com os aspectos reprodutivos considerando-se número de ovos postos e viabilidade de ovos?

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1 Teste de ecotoxicidade com *D. rerio*

Os adultos de *D. rerio* foram colocados em aquários de 2 L com água desclorada tratada com filtro de carvão ativado em pó. As variáveis dureza e pH foram ajustadas para 44 mg de $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e $7,5 \pm 0,5$, respectivamente, com aeração constante. A temperatura permaneceu em 26°C (± 1) e o fotoperíodo foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão (OCDE, 2012). Após o período de adaptação, foram realizados testes de sensibilidade do lote (ABNT NBR 15499/2015), pela exposição dos organismos a diferentes concentrações (0; 5; 7,5; 11,25; 16,88; 25,32 g $\text{NaCl}\cdot\text{L}^{-1}$), com base na concentração letal a 50% dos organismos, num período de 96h CL(I)50 , 96h. Para os testes de toxicidade, foram determinados o comprimento do corpo das fêmeas e machos adultos (2,8 – 4,1 cm) de 5 meses de idade e relacioná-los com a maturação gonadal (Maack; Segner, 2003).

O corante puro absoluto (PA) padrão Dynatech, foi adquirido da própria empresa e o corante padrão comercial 86% de pureza (PC), da empresa Sigma Aldrich. Foram realizados ensaios para verificar a degradação dos corantes com curva de calibração para o comprimento de onda de 427 nm da tartrazina (Fisqp Dynac 006 –Dynatch 2016) na resolução 0,01 do espectrofotômetro UV-1800, fotoperíodo de 12: 12h. A concentração da solução mãe, de 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, foi preparada nos padrões 0; 2,5; 7,5; 10; 12,5 e 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para manter uma relação linear entre as variáveis, avaliando a relação entre o grau pureza da substância e sua degradação. As alíquotas de cada uma dessas soluções foram removidas às 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h para medir o oxigênio. As análises químicas dos corantes foram realizadas pela Merieux NutriSciences.

Os ensaios foram montados com nove fêmeas e dezoito machos para as reproduções e dez machos e dez fêmeas para as análises histológicas para cada concentração do corante: 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (PC) e de 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (PA) e 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (PA) e o controle. O controle experimental foi realizado com água reconstituída (água para cultivo). Durante os testes, os peixes receberam a ração comercial de Tetramim (97% de proteína bruta) duas vezes por dia e nos últimos sete dias, antes do término dos ensaios, a alimentação foi incorporada com náuplios de artêmias salinas adquiridas comercialmente.

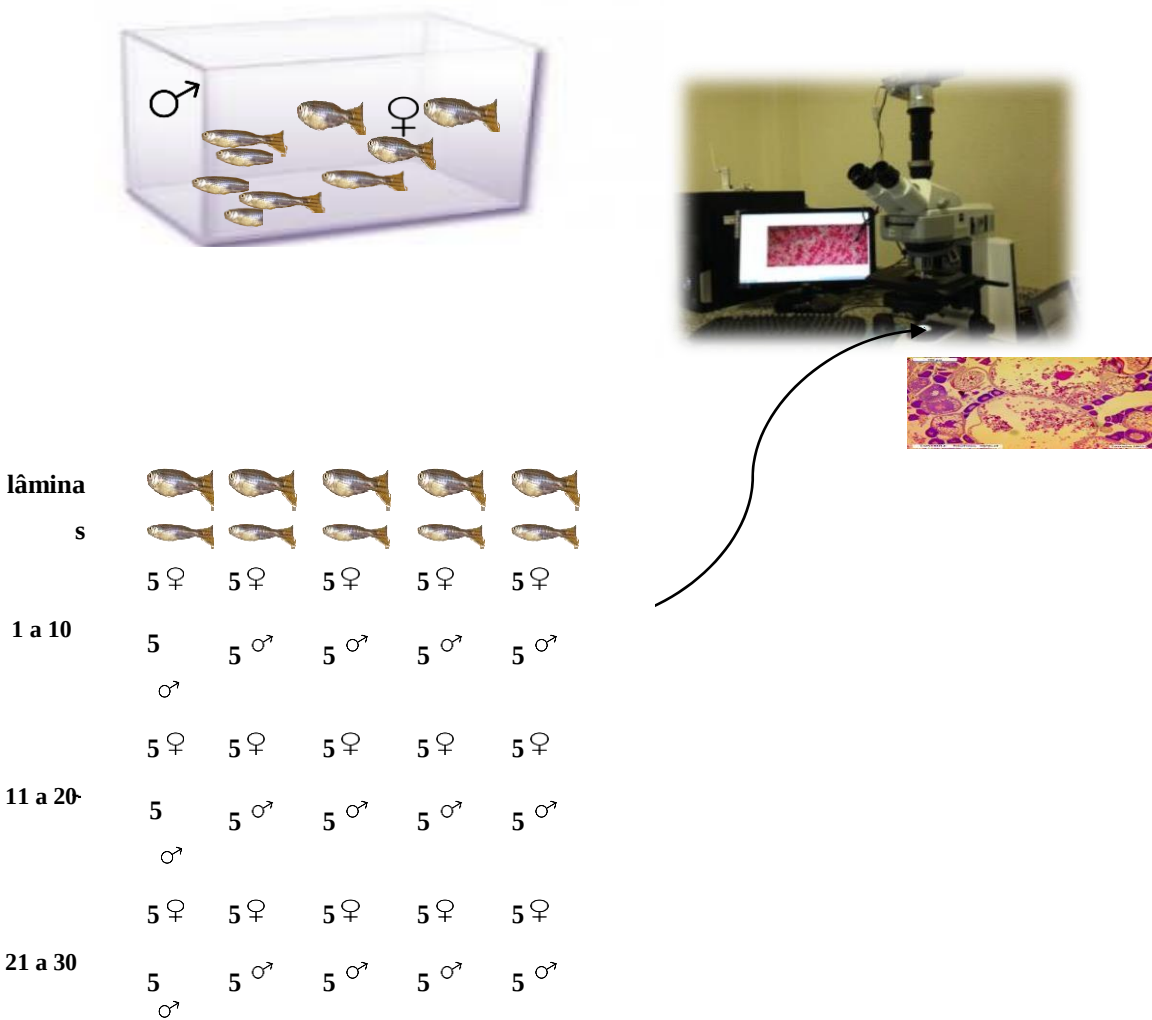
A solução-teste foi trocada a cada 48h para assegurar confiabilidade nas concentrações dos corantes. Após o período do teste crônico, as reproduções foram realizadas em triplicata na proporção de uma fêmea para dois machos (ABNT NBR 15499/2015), escolhida aleatoriamente em cada condição experimental, para análises da eficiência nas reproduções (refletidas em número de ovos viáveis) e monitoramento do seu desenvolvimento na fase larval. Os organismos destinados às análises histológicas foram retirados dos experimentos e imediatamente eutanasiados em água com gelo a 4°C (Wilson et al., 2009) e fixados em formol 10% por 10 horas, lavados em água corrente por aproximadamente 60 segundos e em seguida, trocados para uma solução de álcool 70% para o processamento histológico.

5.2.1.1. Tratamento histológico das gônadas

Para obtenção dos tecidos das gônadas de machos e fêmeas de *D. rerio*, expostos aos corantes, foi realizada a microtomia seriada no abdômen total dos organismos-testes, com espessuras variando entre 4µm e 6µm, utilizando-se de navalhas de aço descartáveis, em micrótomo modelo Micron HM 340E. A coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (HE).

Em cada tratamento e controle, cinco peixes fêmeas e cinco peixes machos foram completamente cortados, perfazendo trinta lâminas para cada peixe. Considerando-se a profundidade do corte no tecido, classificaram-se 3 fases, descritas como fase de cortes iniciais, intermediários e finais, 10 lâminas para cada uma das fases foi montada e numeradas em estratos de 1 a 10 (fase inicial do corte), 11 a 20 (fase intermediária) e 21 a 30 (fase final), objetivando-se obter uma análise quantitativa. Foram analisadas cinco lâminas de cada fase, totalizando quinze lâminas para cada peixe e para cada tratamento, em microscópio óptico (Leica Application Suite - DM 3000 LED) e fotografados. As fotos foram analisadas, segundo alterações nas estruturas das gônadas quando comparados aos tecidos-controle. As alterações foram baseadas na OECD (2010) e em Dietrich; Krieger (2009) e Leo Van der Ven (2003). (Figura 1)

Figura 1. Desenho experimental da metodologia usada para a reprodução e cortes histológicos dos ensaios com o corante amarelo tartrazina nas concentrações de 50 mg.L⁻¹ PC, 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA e controle.



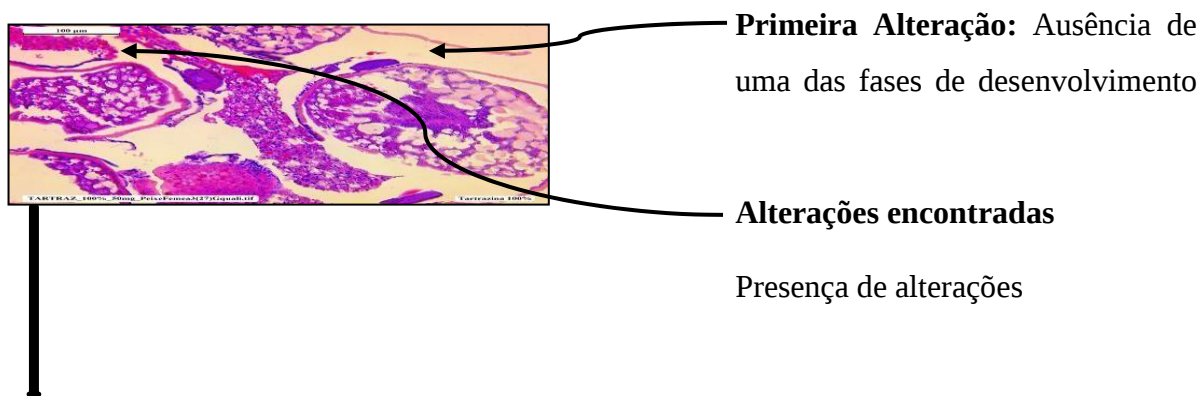
Fonte: Autoria própria

5.2.1.1.1. Método de análise quali-quantitativo

Foi realizado contagens das lâminas que apresentaram alterações nas gônadas femininas e masculinas para uma análise quali-quantitativa. Para cada peixe, quinze lâminas foram montadas segundo a profundidade do corte da lâmina, portanto houve segurança no procedimento das análises. As alterações analisadas foram a ausência de uma das fases no desenvolvimento das gônadas, somado às alterações que foram encontradas nas lâminas, dessa forma, descreveu-se um Fator de Impacto – FI (Figura 2).

Figura 2. Desenho amostral do método quali-quantitativo adotado para a presente pesquisa.

Cálculos Quali-quantitativos através do Fator de Impacto - FI



Cálculo Quali-Quantitativo:

Qualitativo = Descrições das alterações encontradas nas lâminas

Quantitativo = Número de lâminas observadas

Portanto:

Nº Lâminas alteradas + Alterações descritas = Fator de Impacto – FI

5.3. Análise da degradação do corante amarelo tartrazina

A curva de calibração foi traçada usando o comprimento de onda de 427 nm da tartrazina (Nº Fisqp Dynac 006 -Dynatch 2016) na resolução de 0,01 do espectrofotômetro UV-1800, 12:12h fotoperíodo. A concentração de 16 g.L⁻¹ como solução estoque foi preparada para o padrão comercial 86% e a concentração de 10 g.L⁻¹ foi preparada como solução estoque para o padrão analítico 100% e a partir destas, soluções de 0; 1;5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg L⁻¹ foram preparadas para manter uma relação linear entre as variáveis e avaliar a relação entre o grau de pureza da substância e sua degradação e em períodos de 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h, foram removidos aliquotas do corante para medir o pH, oxigênio dissolvido e a condutividade.

A determinação dos metais dos corantes padrão analítico (PA) e padrão comercial (PC) foi feita por espectrometria de emissão de plasma: método de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) de acordo com o método 3120B (APHA 2012). As amostras foram preparadas de acordo com EPA US 3010A (1992). Seguindo as recomendações dos Métodos Padrão (APHA 2012) as concentrações de nitrogênio total usando o método 4500 A, nitrato usando o método 4110 B e nitrito usando o método 4500 B.

5.4. Análises estatísticas

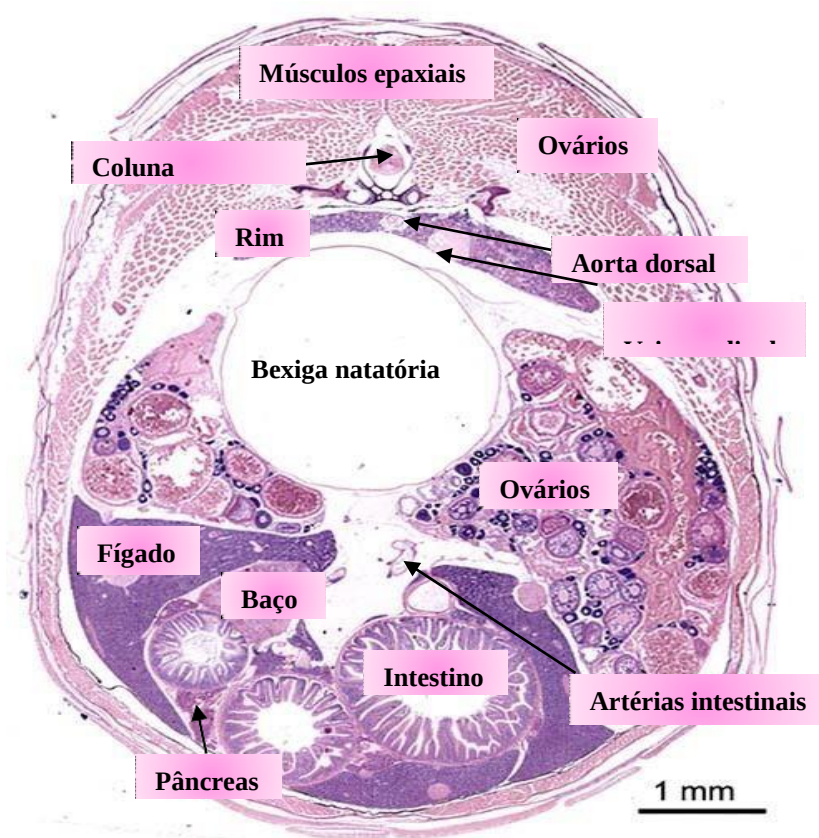
O número total de ovos, embriões e larvas de *D. rerio* de cada reprodução e de cada concentração foram submetidos ao teste paramétrico de ANOVA (Ayres et. al. 2007) e na correlação destes com os elementos químicos dos corantes foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. As alterações nas gônadas de cada lâmina no controle e nas concentrações, foram comparados usando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, após testes de normalidade de Shapiro-Wilk para as análises qualitativas e quantitativas. Para essas análises, foram montadas também, para cada lâmina, tabelas de análises das fases de desenvolvimento e de alterações encontradas nas gônadas, e uma análise de Fator de Impacto (FI) segundo cada concentração, comparada com o controle. Foram utilizados os programas estatísticos, BioEstat 5.3 (Ayres 2007) e Toxstat 3.5 (West Inc. & Gulley 1996).

5.5. Análise qualitativa das gônadas de *D. rerio*

5.5.1. Gônadas femininas

Morfológicamente são órgãos pares, saciformes e sustentados dorsalmente na cavidade celômica pelo mesovário. Os ovários direito e esquerdo unem-se na extremidade caudal para formar o ducto ovariano, que se comunica com a papila urogenital. A forma, o volume, a coloração e a irrigação sanguínea dos ovários variam, nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Costa, 2004). (Figura 3).

Figura 3. Localização do ovário, seção axial de *D. rerio* fêmea adulto, observando-se que o ovário ocupa aproximadamente um terço da área total.



Fonte: Van der Ven & Wester (2003) adaptado

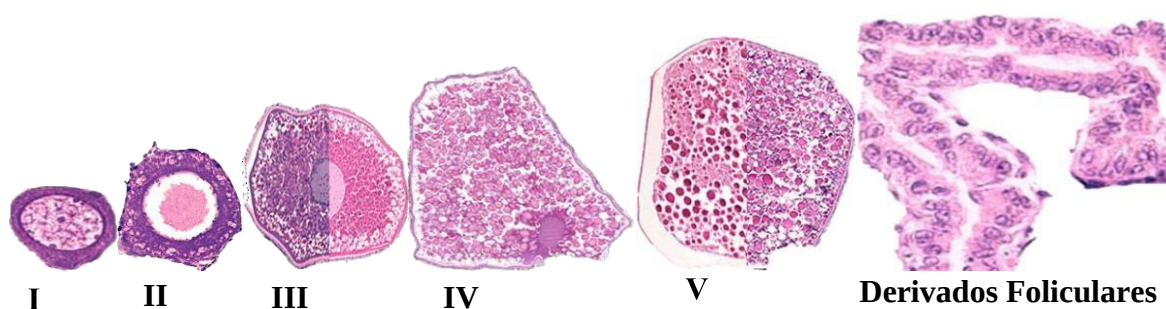
5.5.1.1. Estrutura dos ovários maduros

OS folículos ovarianos compreendem o ovócito, células foliculares e membrana vitelina. Processos mitóticos iniciam a ovogênese, com proliferação e diferenciação de ovogônias. Nesse estágio, o citoplasma é escasso com facilidade para observar-se o núcleo, nucléolo e ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos. Os folículos ovarianos desenvolvem-se em meiose e os folículos pós-ovulatórios são estruturas remanescentes nos ovários pós-ovulação. Observa-se cinco estágios durante o processo de maturação (Schultz *et al.*, 2002; Van der Ven & Wester, 2003), conforme abaixo:

- I. **Estágio 1:** primeira divisão meiótica. Células pequenas, em ninhos; citoplasma reduzido; aumento do tamanho do núcleo que também é referido como “vesícula germinal”; nucléolo único, basófilo e central; células foliculares associadas de crescimento primário.
- II. **Estágio 2:** Células foliculares pavimentosas envolvem o ovócito e permanecem dessa forma durante todo o processo. O ovócito apresenta um tamanho maior; aumento do tamanho da vesícula germinal; citoplasma se torna mais volumoso, mas ainda reduzido em relação ao núcleo, que começa a sofrer fragmentação nucleolar; células foliculares estão presentes.
- III. **Estágio 3:** Surgem vesículas citoplasmáticas na periferia do ovócito (sem afinidade por HE) e a membrana vitelina (envolvendo o ovócito). O citoplasma é mais volumoso e menos basófilo. Os nucléolos se encontram periféricos ao núcleo.
- IV. **Estágio 4:** Caracterizada pela presença de dois tipos de inclusões citoplasmáticas no ovócito: as vesículas citoplasmáticas e os grânulos de vitelo; a membrana vitelina sofre um espessamento, com estriações transversais evidentes. Apresenta de células foliculares.
- V. **Estágio 5:** O ovócito sofre um aumento de volume; o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos de vitelo acidófilos; o núcleo apresenta o seu contorno irregular contendo diversos nucléolos basófilos na periferia; a membrana vitelina permanece inalterada. Os ovários são revestidos pela túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo, fibras musculares lisas e vasos sanguíneos. Essa túnica emite septos em direção ao lume, formando lamelas ovígeras, nas quais se encontram os folículos ovarianos (OECD, 2010).

VI. Derivados foliculares: corpo atrésico (pós-ovulatório). Envelope colapsado de antigas células da granulosa. Células hipertróficas com núcleos lobulados. A estrutura começa a declinar dentro de um dia e será removida em sete dias (Figura4).

Figura 4: Esquema com imagens de ovócitos representando o desenvolvimento ovocitário em peixes.



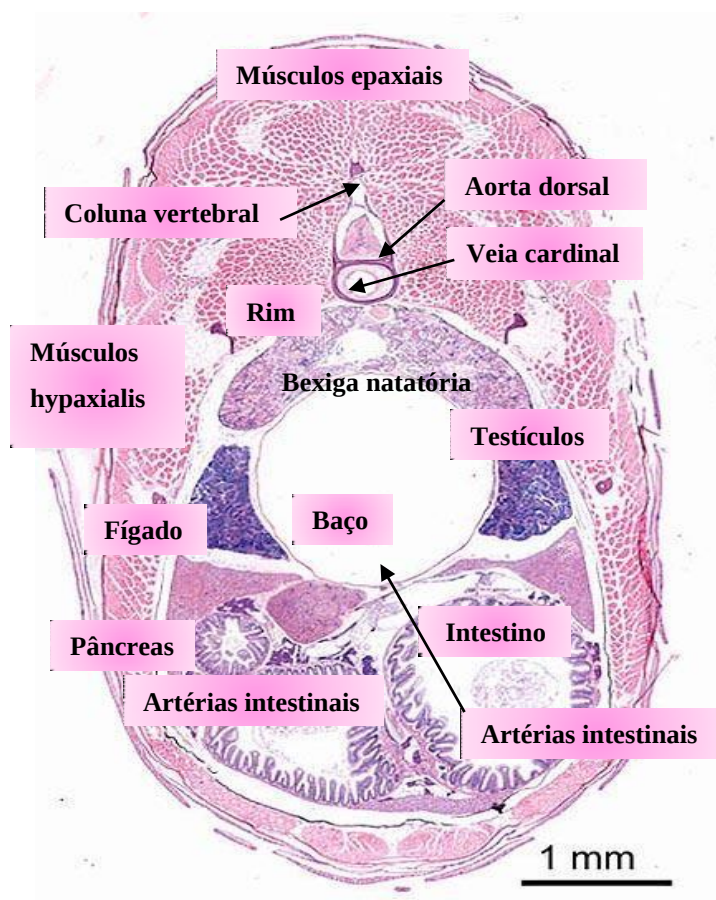
Fonte: Autoria própria

Legenda: **Fase I** – Ovogônias; **Fase II** – Ovócitos de reserva; **Fase III** – Ovócitos c grânulos lipídicos; **Fase IV** – Ovócitos com vitelogênese lipídica e proteica; **Fase V** – Ovócitos com vitelogênese completa e **Derivados Foliculares**.

5.5.2. Gônada masculina

Os testículos do *D. rerio* são órgãos pares localizados na cavidade celômica e sustentados dorsalmente pelo mesórquio. Apresentam uma porção central e contínua que se comunica com o ducto espermático, o qual se abre no exterior através da papila urogenital. A forma, o volume, a coloração e a irrigação sanguínea também variam nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Costa, 2004). (Figura 5).

Figura 5. Localização do testículo, seção axial de *D. rerio* macho adulto.



Fonte: Van der Ven & Wester (2003) adaptado

5.5.2.1. Estrutura do testículo maduro

Os túbulos seminíferos são separados por fios finos de tecido conjuntivo intersticial. Este tecido intersticial contém células do tecido conjuntivo e células de Leydig (células de tamanho intermediário com núcleo oval redondo), que produzem andrógeno quando estimuladas pelo hormônio gonadotrófico derivado da hipófise.

No lado luminal da membrana basal que limita os túbulos, grandes células solitárias de espermatogônio podem ser encontradas. Essas células germinativas são uma fonte contínua de células espermatogênicas para o tecido que se renova ativamente e, após a divisão, dão origem a uma geração de espermatogônias. Após um número limitado de ciclos proliferativos, a espermatogonia entra na meiose para dar origem a espermatócitos, que estão contidos nos espermatocistos. A proliferação de espermatogônias é induzida quando essas células estão sendo envolvidas por células de Sertoli. Células de Sertoli têm núcleo irregular e servem como um mediador na estimulação androgênica das células espermatogênicas.

As células espermatogonais ocorrem aleatoriamente em todo o trecho dos túbulos e, conseqüentemente, espermatocistos com vários estágios de maturação podem ser encontrados em qualquer lugar. Essa organização é irrestrita, em contraste com o tipo de testículo restrito, em que a espermatogonia reside na periferia do órgão, diretamente sob a túnica albugínea da cobertura. Essas espermatogônias residuais produzem espermatocistos de maturação síncrona, que migram simultaneamente para um túbulo central.

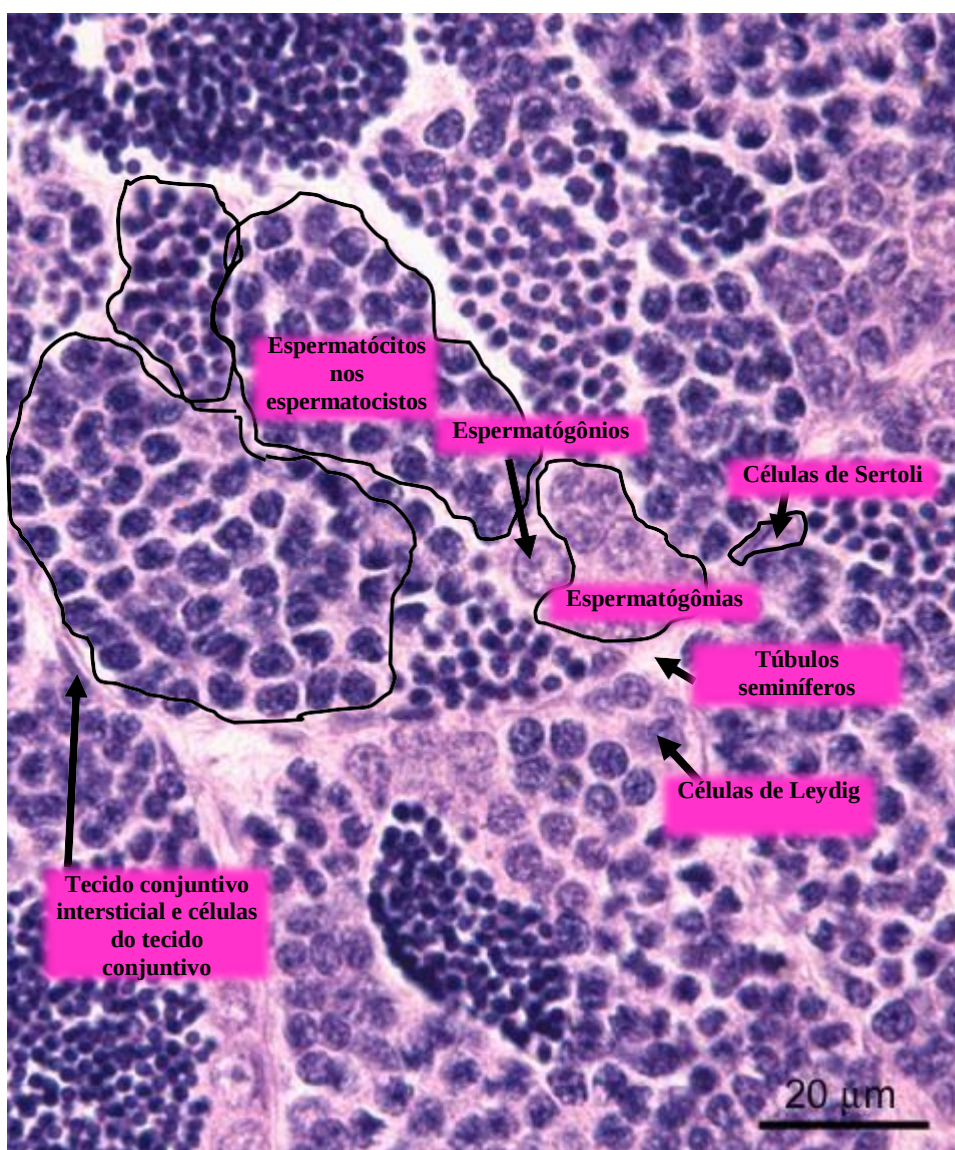
As células de Leydig, também conhecidas como células intersticiais, são encontradas no espaço intersticial entre os túbulos testiculares. Essas células têm núcleos redondos ou ovais com formato regular. Ocasionalmente, esses aglomerados maiores também podem estar presentes na periferia do testículo. Além das células de Leydig, fibroblastos e células musculares lisas, também estão presentes no interstício.

As células de Leydig são a fonte de andrógenos. A produção de andrógenos nos teleósteos é estimulada pela gonadotrofina derivada da hipófise, e a produção de gonadotrofinas está parcialmente sob controle de *feedback* dos níveis plasmáticos de androgênio; além disso, também é possível a auto-regulação da expressão androgênica no nível das células de Leydig. Abaixo, o desenvolvimento das gônadas masculinas e Figura 6.

- I. **Desenvolvimento inicial** – a característica inicial da diferenciação da gônada masculina é o aparecimento de uma organização agrupada (espermatocistos), com crescimento do estroma. Estágios iniciais de diferenciação são gonócitos predominantes, indiferenciados e abundantes.

- II. Desenvolvimento intermediário** - espermatocistos e formação de lúmen como indicações de diferenciações precoces do sexo masculino. O epitélio espermatogênico contém principalmente estágios iniciais e intermediários de diferenciação até espermátides iniciais, aparecem aglomerados de gonócitos indiferenciados.
- III. Desenvolvimento avançado** – a gônada pode ser identificada como uns testículos pela presença de luminárias bem desenvolvidas que nessa fase estão cheias de espermatozoides, espermatocistos e espermatogonias.

Figura 6. Detalhes da estrutura do testículo maduro



Fonte: Van der Ven & Wester (2003) adaptado

5.6. Resultados

5.6.1. Análises da degradação do corante amarelo tartrazina

O corante não degradou dentro do período de 96h demonstrando estabilidade da molécula a partir das análises de pH dos corantes PC 86% (Figura 7), (Tabela 1) e PA 100% (Figura 8, Tabela 2). O pH permaneceu dentro da faixa de 7,2 – 7,7 atribuindo caráter básico a solução, e através das curvas de calibração dos corantes com PC 86% de equação: $y = 0,0356x - 0,0115$, com coeficiente de determinação $R^2=0,09994$ (Figura 7) e PA 100% de equação: $y = 0,0626x - 4E-05$ com coeficiente de determinação $R^2=0,09998$ (Figura 8).

A relação entre pH e degradação do corante tartrazina foi estudada, sendo que o processo de degradação do corante depende primordialmente do pH da solução. Em pH mais ácidos, a degradação é acelerada por um mecanismo de redução do corante e posterior clivagem. (Ostroski et al., 2005). Sendo assim a estabilidade do corante neste caso foi confirmada, não só pela grande estabilidade da molécula (Marmitt et al., 2010; Sleiman et al., 2007), mas também pela continuidade do pH na faixa de 7,0, não resultando em uma solução ácida, o que favoreceu a não degradação do corante.

O oxigênio dissolvido permaneceu maior que $3,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e a condutividade ficou abaixo de 7 mS. A tartrazina possui alta solubilidade em meio aquoso, devido à presença de cromóforos, grupos carboxílicos, nitro, hidroxí e amino que são capazes de aumentar os intensidade de absorção do corante (Del Giovine e Bocca 2003), portanto de difícil descoloração.

Figura 7. Curva de calibração da degradação do corante amarelo tartrazina PC 86%, a partir da concentração de 16 g.L⁻¹

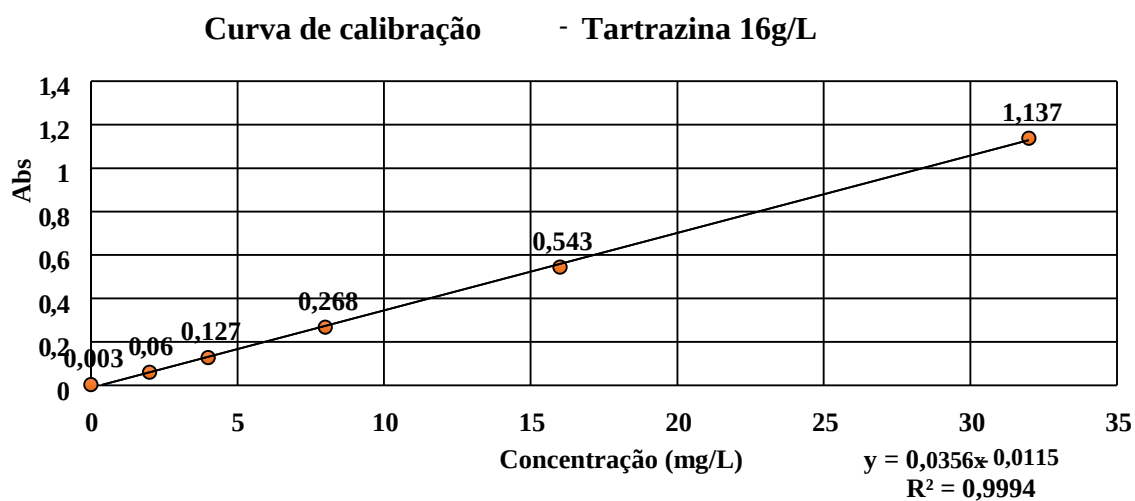


Tabela 1. Análises de pH e concentração nos diferentes tempos (PC 86%)

	Início		6 h		12 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
Controle	pH 7.6		pH 7.7		pH 7.5		pH 7.4		pH 7.3		pH 7.3		pH 7.3	
Amostra 1	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH
	32.03	7.6	32.69	7.6	32.57	7.5	32.65	7.7	33.72	7.3	32.66	7.2	32.49	7.2
Amostra 2	32.03	7.6	32.69	7.6	32.57	7.5	32.65	7.7	32.72	7.3	32.66	7.2	32.49	7.2
Amostra 3	32.06	7.6	32.54	7.5	32.59	7.5	32.5	7.5	32.34	7.3	32.42	7.3	32.54	7.3

Conc = máxima concentração (mg.L⁻¹)

Figura 8. Curva de calibração da degradação do corante amarelo tartrazina PA 100% a partir da concentração de 10 g.L⁻¹

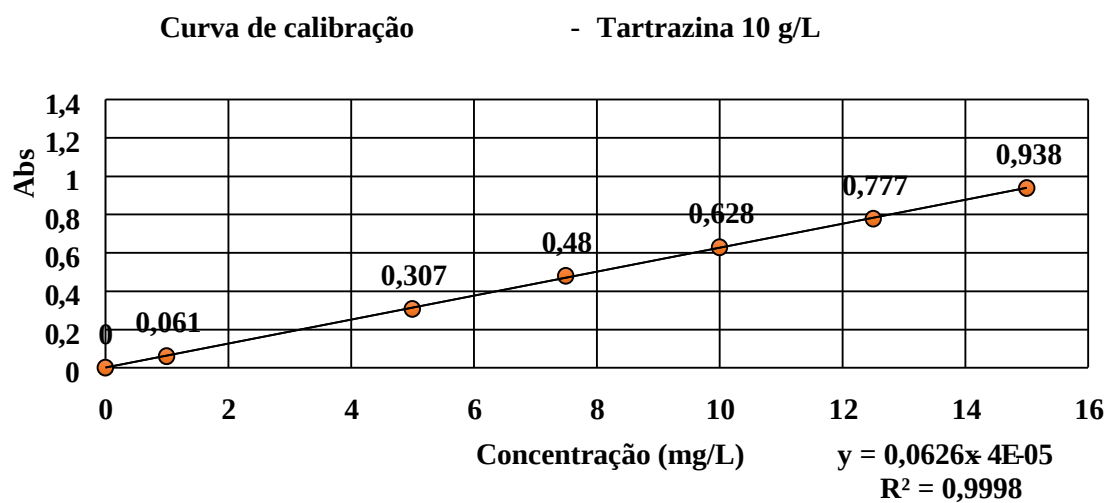


Tabela 2. Análises de pH e concentração nos diferentes tempos (PA 100%)

	<u>Início</u>		<u>6 h</u>		<u>12 h</u>		<u>24 h</u>		<u>48 h</u>		<u>72 h</u>		<u>96 h</u>	
Controle	pH 7.6		pH 7.7		pH 7.5		pH 7.4		pH 7.3		pH 7.3		pH 7.3	
	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH	Conc.	pH
Amostra 1	32.03 – 7.6		32.69 – 7.6		32.57 – 7.5		32.65 – 7.7		33.72 – 7.3		32.66 – 7.2		32.49 – 7.2	
Amostra 2	32.03 – 7.6		32.69 – 7.6		32.57 – 7.5		32.65 – 7.7		32.72 – 7.3		32.66 – 7.2		32.49 – 7.2	
Amostra 3	32.06 – 7.6		32.54 – 7.5		32.59 – 7.5		32.5 – 7.5		32.34 – 7.3		32.42 – 7.3		32.54 – 7.3	

Conc = máxima concentração (mg.L⁻¹)

5.6.2. Reproduções de *D. Rerio*

Considerando-se o parâmetro número de ovos do controle e tratamentos, nos ensaios com os corantes foram obtidos elevados número de ovos. Na concentração de 500 PA, a média de (636 ± 63), ultrapassou em mais de 100% a média do controle (313 ± 11). No entanto, depois de sete dias, o controle produziu 40% de larvas do número inicial de ovos, enquanto que somente 26% de larvas foram produzidas na concentração de 50 PC; 21% na concentração de 50 PA e 15% na concentração de 500 PA (Tabela 3, Figura 9).

Houve diferença significativa (* $p < 0.05$) entre os números viáveis de ovos do controle com os números viáveis em todas as concentrações (50 PC e 50 PA, 500 PA) somente em 0 hpf (horas pós-fertilização) e depois de 72 hpf, a viabilidade dos ovos entre o controle e as concentrações foram as mesmas (Tabela 3, Figura 9).

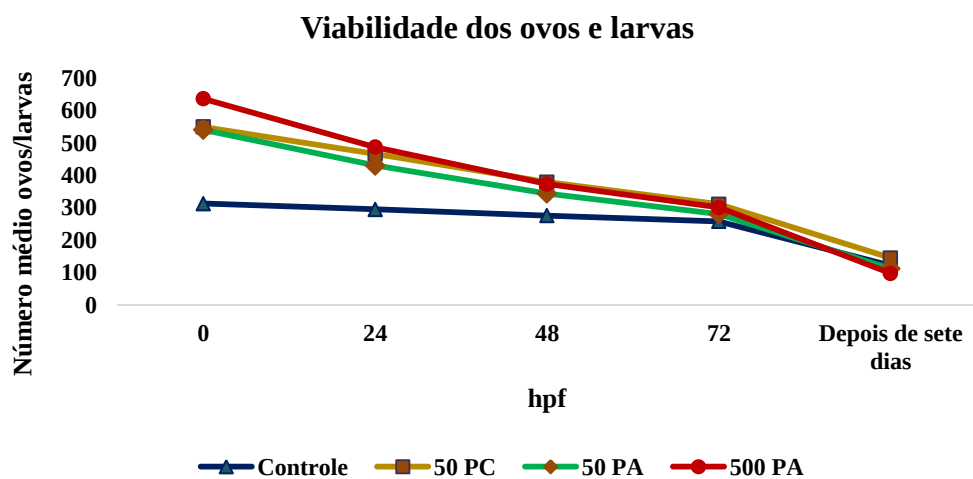
Tabela 3. Média do número de ovos e larvas obtidas nas reproduções de *D. rerio* nos ensaios crônicos com o corante amarelo tartrazina, nas concentrações 50 mg.L⁻¹ PC, 50 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ PA e o grupo controle (* $p < 0.05$).

Média do número de ovos e larvas (n=3) das reproduções da geração F0 em ensaios crônicos de 21 dias				
Hpf	Geração F1			
	Controle	50 mg PC	50 mg PA	500 mg PA
0	313 ± 11	549 ± 53	$540 \pm 54^*$	$636 \pm 63^*$
24	295 ± 8	466 ± 32	430 ± 39	487 ± 66
48	276 ± 8	379 ± 54	344 ± 24	373 ± 58
72	258 ± 8	311 ± 51	281 ± 20	301 ± 102
Após sete dias (larvas)	122 ± 27	145 ± 12	112 ± 11	98 ± 5

± Desvio padrão

hpf – horas pós fertilização

Figura 9. Comparação entre a viabilidade dos ovos (0 e 24 horas pós fertilização) e larvas (48, 72, 96, e após sete dias pós fertilização no controle e nas concentrações (50 mg.L⁻¹ PC; 50 mg.L⁻¹ PA e 500 mg.L⁻¹ PA).



5.6.3. Caracterização química do corante amarelo tartrazina

A análise química do corante detectou alumínio, ferro, fósforo, potássio e estrôncio em maiores quantidades, superados pelos elementos sódio e nitrogênio (Tabela 4).

Tabela 4. Análise química nominal de 500 mg.L⁻¹ dos corantes: analítico (PA 100%) e comercial (PC 86%) e análise estatística do coeficiente de correlação de Spearman dos principais elementos químicos componentes dos corantes com o número de ovos, embriões e larvas de *D. rerio* (*p ≤ 0,05).

Parâmetros (mg.L ⁻¹)	LQ	PA	PC
Alumínio	0.01	0.0160	0.0314
Ferro	0.01	0.071*	0.0522*
Fósforo	0.01	0.460*	0.213*
Nitrogênio total	2.5	24.8	29.75
Potássio	0.5	1.22*	1.084*
Sódio	0.5	63.6*	62.6*

LQ – Limite de quantificação

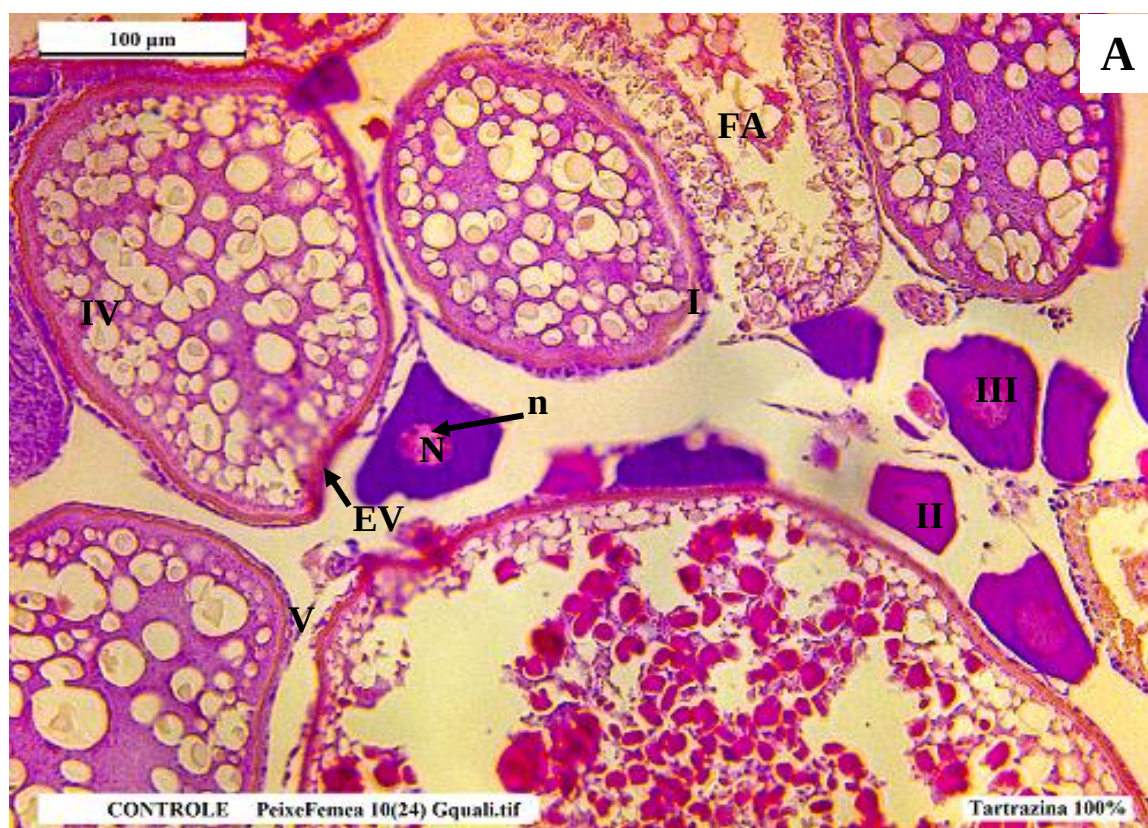
5.6.4. Análises Qualitativas das Gônadas Femininas

Nas análises histológicas são apresentadas duas pranchas com as imagens obtidas do grupo controle e duas para cada tratamento. Pranchas comparativas entre controle e tratamentos foram montadas para melhor visualização das alterações entre os controles e as concentrações.

5.6.4.1. Gônadas femininas – Controle

As análises histológicas das gônadas das fêmeas do controle revelaram padrão normal de distribuição e maturação gonadal, mostrando células em diferentes fases de desenvolvimento e ovários em diferentes estádios de maturação gonadal (OECD 2010, Van der Ven & Wester, 2003). As fêmeas de *D. rerio*, para garantir eficácia na fase reprodutiva, devem apresentar os estágios de maturação, desde a **Fase I** (células germinativas), início da maturação gonadal, até a **Fase V** (oócito com vitelogênese completa), apto para a desova, o que ocorre em condições favoráveis, e em desovas contínuas (OECD, 2010, Connolly et al. 2014; Silva, 2016). (Figuras 10 e 11).

Figuras 10 e 11. Corte histológico de gônadas de fêmeas de *D. rerio* dos controles do ensaio de 21 dias do corante amarelo tartrazina.



Fonte: Acervo pessoal

Legenda: A ovários apresentando ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário, evidenciando as fases de desenvolvimento. **Fase I** - oócitos prévitelogênicos; **Fase II** - oócitos vitelogênicos (estoques de reserva), percebe-se grande núcleo em relação ao tamanho do ovócito; **Fase III** - ovócito com vitelogênese lipídica, nesta fase podemos ver o núcleo e o nucléolo mais evidentes, e seus vacúolos lipídicos mais acentuados; **Fase IV** - ovócito com vitelogênese lipídica e proteica, destaca-se o envelope vitelogênico bem evidente; **Fase V** - ovócito com vitelogênese completa, grânulos de vitelo evidentes, ovócitos maduros; **FA** - folículos atrésicos, Coloração (HE).

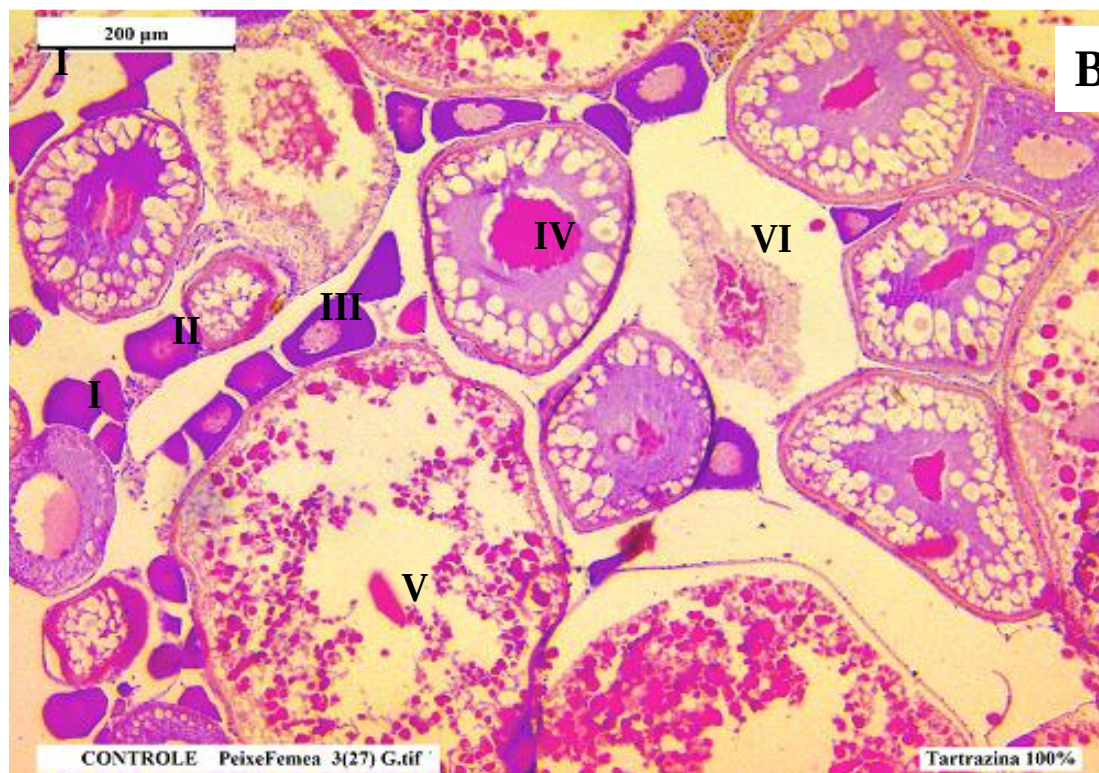


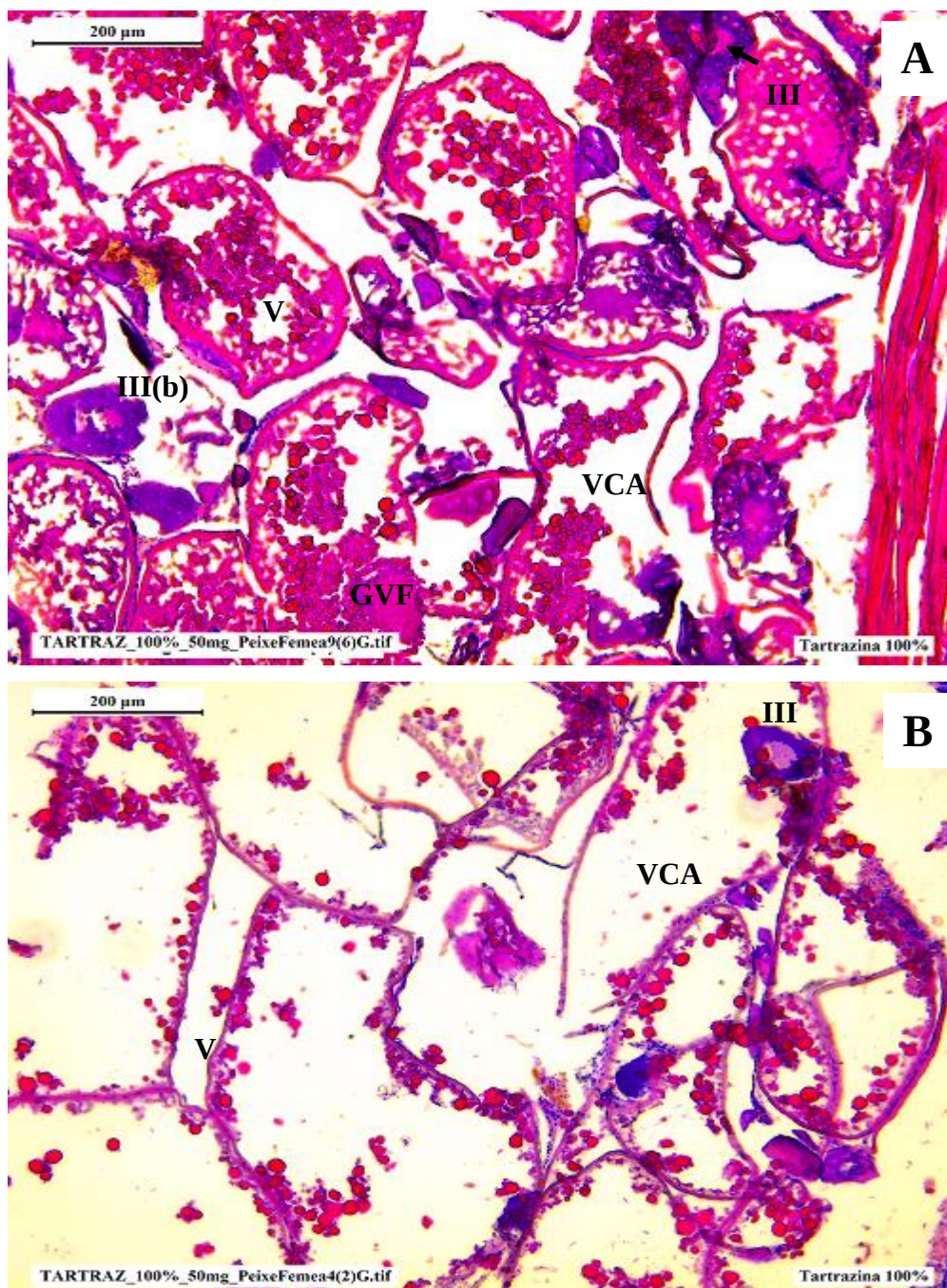
Foto: Acervo pessoal

Legenda: **B** ovários apresentando ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário, evidenciando as fases de desenvolvimento. **Fase I** - oócitos prévitelogênicos; **Fase II** - oócitos vitelogênicos (estoques de reserva), percebe-se grande núcleo em relação ao tamanho do ovócito; **Fase III** - ovócito com vitelogênese lipídica, nesta fase podemos ver o núcleo e o nucléolo mais evidentes, e seus vacúolos lipídicos mais acentuados; **Fase IV** - ovócito com vitelogênese lipídica e proteica, destaca-se o envelope vitelogênico bem evidente; **Fase V**- ovócito com vitelogênese completa, grânulos de vitelo evidentes, ovócitos maduros; **Fase VI** - Folículos atresícos. Coloração (HE).

5.6.4.2. Gônadas femininas - 50 PC

Nas fêmeas expostas ao corante 50 PC por 21 dias, observou-se predomínio de ovócitos com vitelogênese completa avançada (**VCA**), poucos oócitos na **Fase II** (oócitos vitelogênicos com estoques de reserva e ovócito na **Fase III** (lipídica) e ausência de ovócitos **Fase I** (oócitos prévitelogênicos) (Figuras 12 e 13).

Figuras 12 e 13. Corte histológico de gônadas de fêmeas de *D. rerio* da concentração de 50 PC do ensaio crônico com o corante amarelo tartrazina.

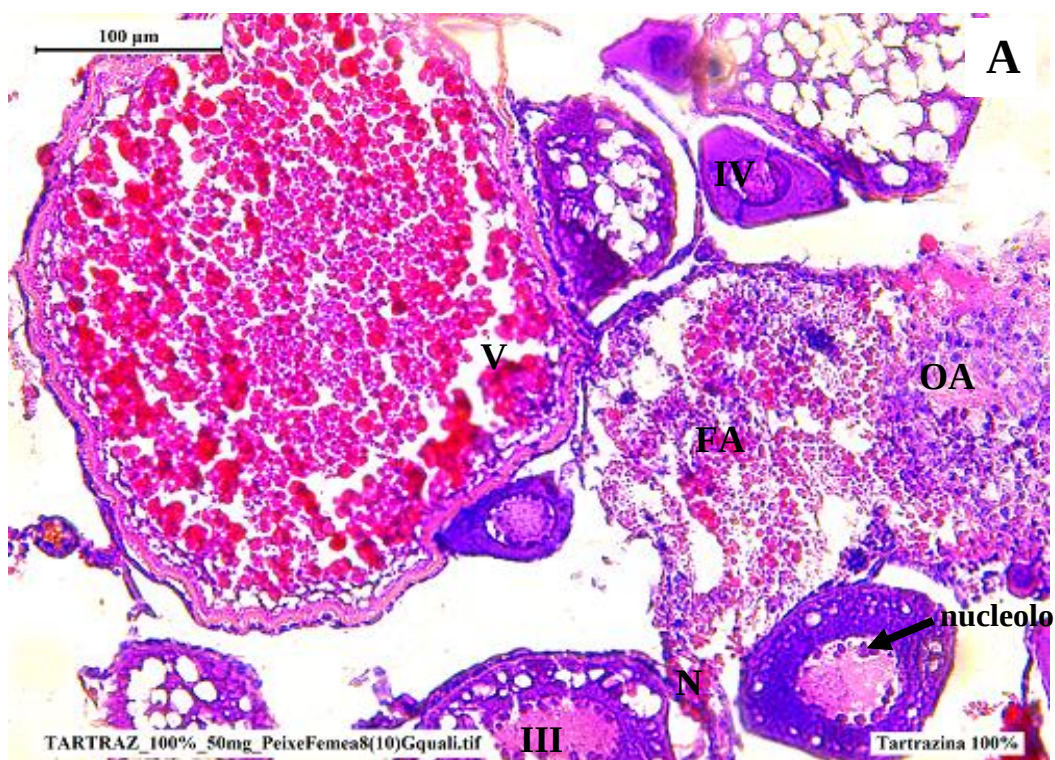


Fonte: Acervo pessoal

Legenda: A. Ovócitos com vitelogênese completa avançada (VCA); ovócito na fase lipídica (III); deformidades dos ovócitos na Fase III(b) e ausência de ovócitos da Fase I (oócitos previtelogênicos); Fase II (oócitos vitelogênicos com estoques de reserva) e Fase IV - ovócito com vitelogênese lipídica e proteica; Fase V, ovócito com vitelogênese completa; GVF presença de grânulos vitelogênicos fundidos. (Coloração HE). **Legenda:** B. Fase III (oócitos vitelogênicos com estoques de reserva) e VCA Vitelogênese completa avançada. Coloração (HE).

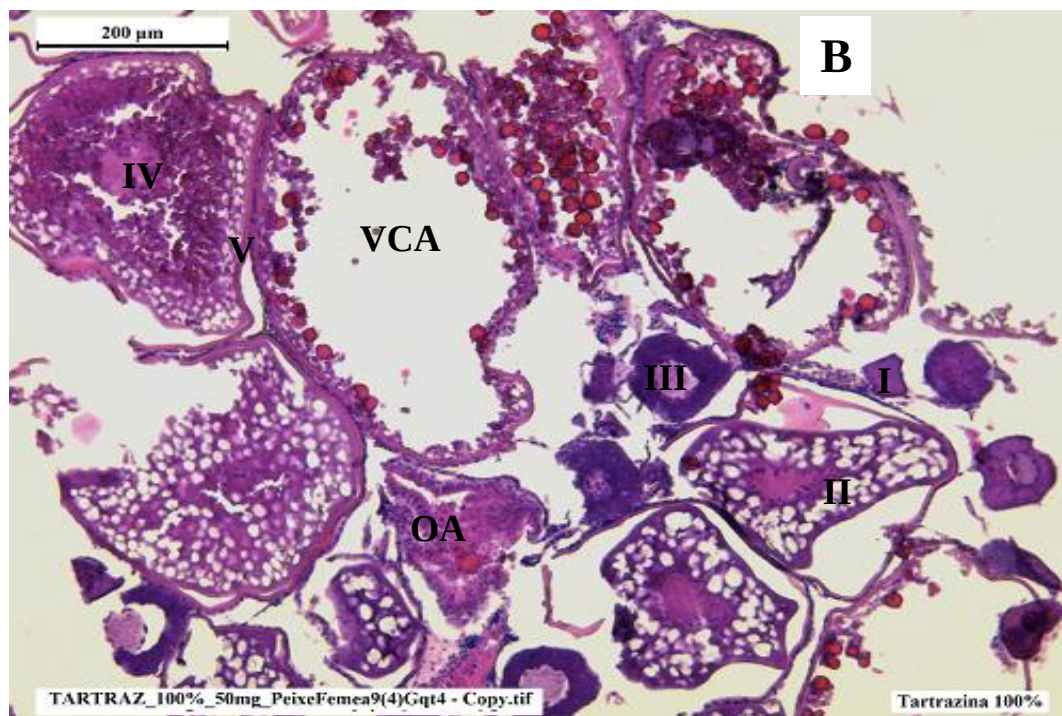
5.6.4.3. Gônadas femininas 50 PA

Nas gônadas das fêmeas expostas ao corante 50 PA por 21 dias, observou-se predomínio de vitelogênese lipídica (**Fase III**), oócito com vitelogênese lipídica e proteica



Fonte: Acervo pessoal

Legenda A. Fase III (ovócito na fase lipídica); Fase IV (ovócito com vitelogênese lipídica e proteica); Fase V (ovócito com vitelogênese completa); CA (vitelogênese completa avançada); OA (oócitos atresícos); FA (folículos atresícos).



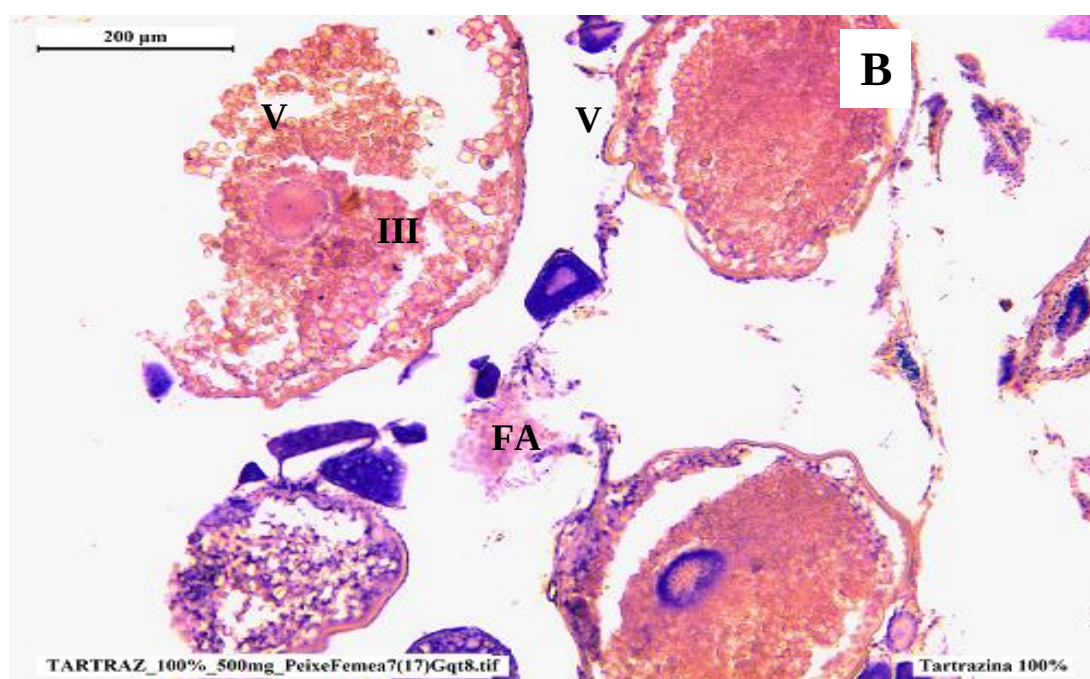
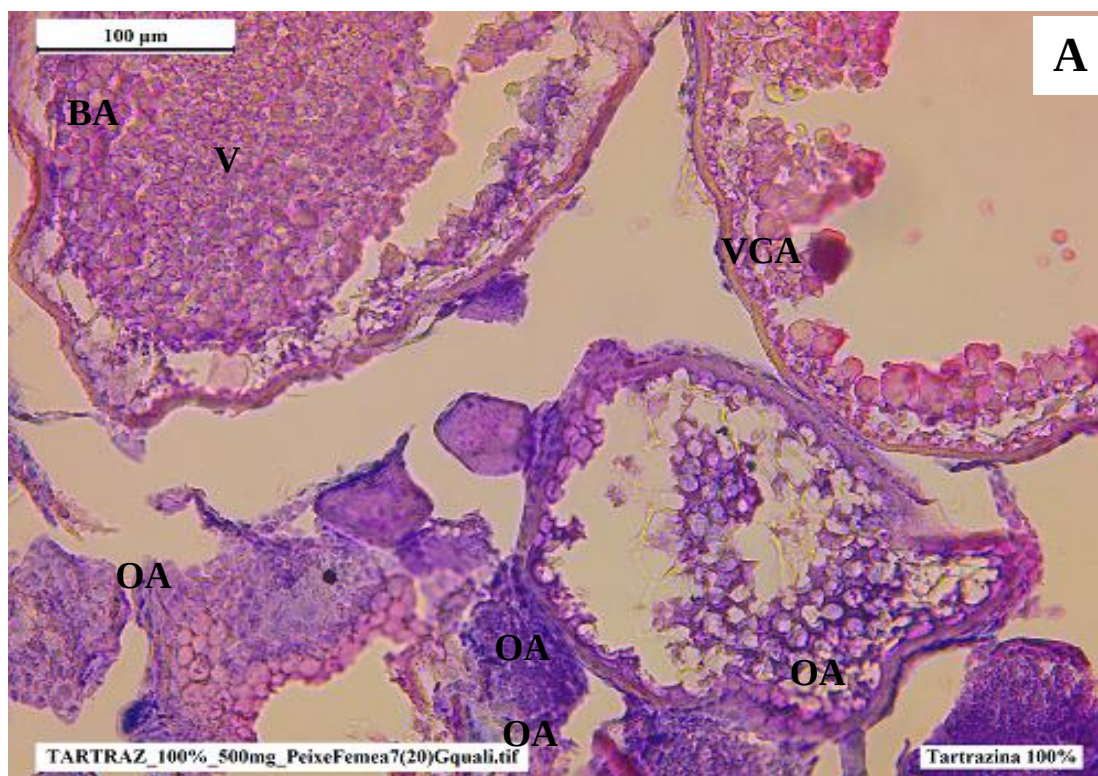
Fonte: Acervo pessoal

Legenda B. ovários apresentando ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário. **Fase I** - oócitos previtelogênicos; **Fase II** - oócitos vitelogênicos (estoques de reserva), **Fase III** - ovócito com vitelogênese lipídica; **Fase IV** - ovócito com vitelogênese lipídica e proteica; **Fase V** (ovócito com vitelogênese completa); **VCA** (vitelogênese completa avançada); **OA** (oócitos atrésicos). Coloração (HE).

5.6.4.4. Gônadas femininas 500 PA

Nas fêmeas expostas ao corante 500 PA por 21 dias, observou-se predomínio de ovócitos com vitelogênese completa (V) e vitelogenia completa avançada (VCA), grandes áreas com oócitos atrésicos (OA) e folículos atrésicos (FA) e áreas com basófilos atípicos (Figuras 14 e 15).

Figuras 14 e 15. Corte histológico de gônadas de fêmeas de *D. rerio* da concentração 500 PA do ensaio crônico com o corante amarelo tartrazina.



Fonte: Acervo pessoal

Legenda: A. Ausência das fases I, II, III e IV; presença da Fase V (ovócito com vitelogênese completa); VCA (vitelogênese completa avançada); OA (oócitos atresícos) e presença de basófilos atípicos. **Legenda:** B. Fase III - ovócito com vitelogênese lipídica; Fase V (ovócito com vitelogênese completa); FA (folículos atresícos); BA (basófilos atípicos).

5.6.5. Análises Quali - Quantitativas das Alterações nas Gônadas Femininas

Nessas análises, cinco lâminas de cada fase de corte para cada peixe foram analisadas (totalizando 15 lâminas para cada peixe), segundo:

5.6.5.1. Presença/Ausência das fases de desenvolvimento ovocitário

Fases I - oócito prévitelogênico

Fase II - oócito vitelogênico;

Fase III - oócito com vitelogênese lipídica

Fase IV - oócito com vitelogênes lipídica e proteica

Fase V - vitelogênese completa

No controle, foram observados todas as fases de desenvolvimento, apenas em algumas lâminas não foram observados o folículo pós-ovulatório (**PO**).

Na concentração 50 PC observou-se 100% de ausência da **Fase I** e 100% de ausência da fase pós-ovulatório (**PO**); em 83%, observou-se somente a **Fase V** e em 50%, além da **Fase V**, observou-se as **Fases II e IV** ou **Fases III e IV** (Tabela 5).

Na concentração 50 PA, observou-se que a Fase V estava presente em todas as lâminas. Em 83%, somente a Fase V; e em 67%, além da Fase V, a Fase III ou a Fase IV e 50% Fase V, III e IV (Tabela 5).

Na concentração 500 PA, observou-se e 83% a ausência das fases de I a IV de desenvolvimento oocitário, nas lâminas observadas, somente a Fase V estava presente.

Tabela 5. Fases do desenvolvimento dos oócitos das gônadas femininas. O campo marcado representa a ausência de uma das fases (50 PC; 50 PA e 500 PA).

	Controle					50 PC					50 PA					500 PA				
Peixes	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
Oócitos Fase I																				
Oócitos Fase II																				
Oócitos Fase III																				
Oócitos Fase IV																				
Oócitos Fase V																				
Folículo PO*																				
Total (%)	17	0	0	0	17	83	50	50	50	83	67	50	83	67	83	83	83	83	83	83

P1 a P5 = Peixes 1 a 5

■ Ausência de umas das Fases de Desenvolvimento das gônadas femininas

*PO = Pós – ovulatório

5.6.5.1.1. Gônadas femininas – Alterações significativas

Para análise das alterações, foram consideradas as pranchas que apresentaram gônadas femininas alteradas em mais de 50% das fotos. As alterações observadas foram: Vitelogênia Completa Avançada (**VCA**); Oócitos Atrésicos (**OA**); Folículos Atrésicos (**FA**) e Basofilia Atípica (**BA**).

Não foram observadas alterações no controle; na concentração 50 PC, 25% das alterações consideradas foram de Vitelogênia Completa Avançada (**VCA**); na concentração de 50 PA, 25% de Vitelogênia Completa Avançada e 50% de Oócitos Atrésicos e na concentração de 500 PA, Vitelogênia Completa Avançada e 50% com Oócitos Atrésicos ou Basófilos Atípicos; 75%, além dessas alterações, também apresentaram Folículos Atrésicos. As análises foram resumidas na Tabela 6 (Figura 16).

Tabela 6. Alterações significativas nas gônadas analisadas no controle e nas concentrações dos corantes (50 PC; 50 PA e 500 PA)

Peixes Oócitos	Controle					50 PC					50 PA					500 PA				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
VCA																				
AO																				
FA																				
BA																				
Total (%)	0	0	0	0	0	25	25	25	25	25	50	50	50	25	25	50	100	75	50	50

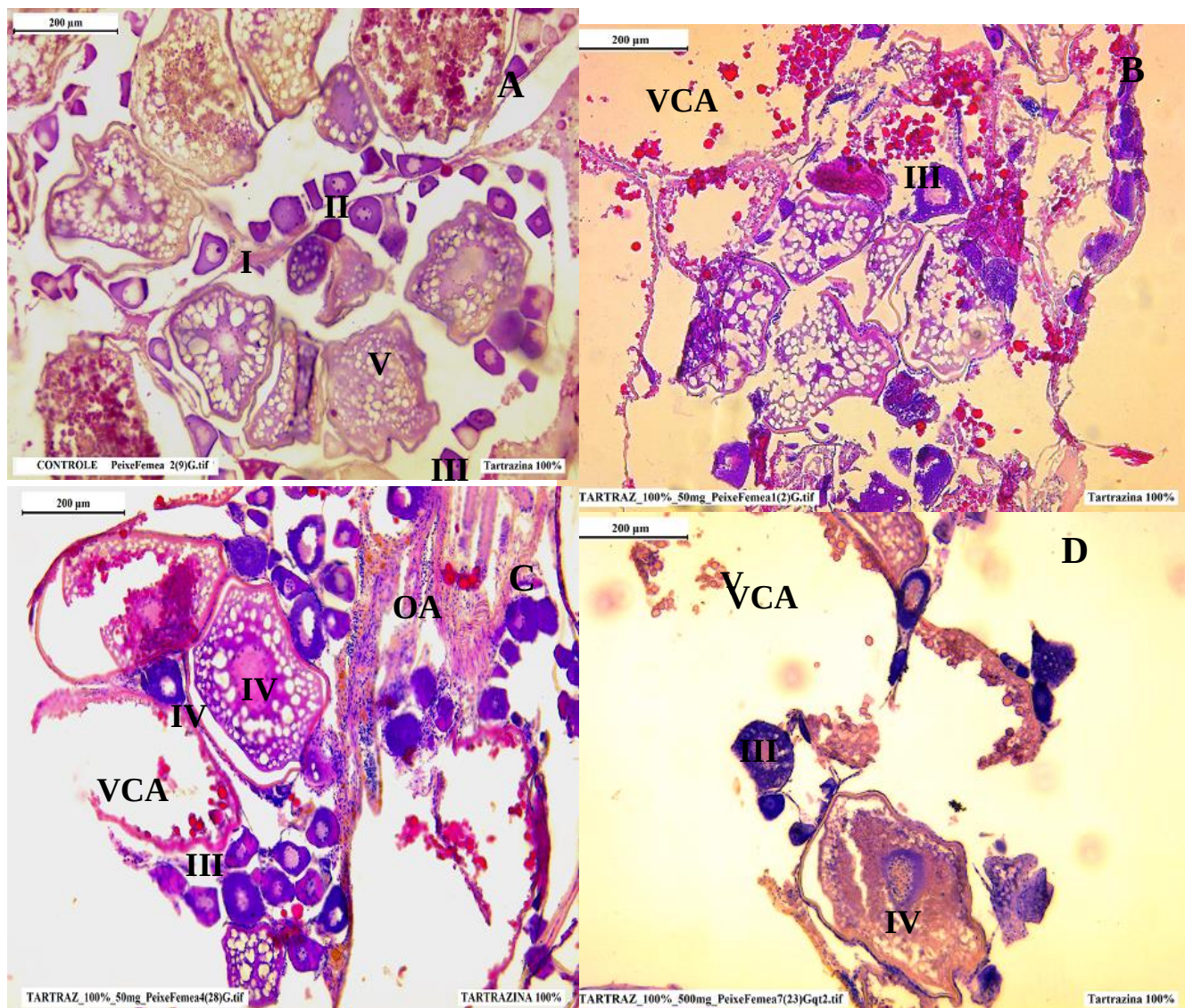
P1 a P5 = Peixes 1 a 5

Presença de Alterações nas Gônadas

VCA – Vitelogênese Completa Avançada; **AO** – Oócitos Atrésicos; **FA** – Folículos Atrésicos;

BA – Basófilos Atípicos.

Figura 16. Alterações significativas nas gônadas analisadas no controle e nas concentrações dos corantes (50 PC; 50 PA e 500 PA)



Legenda: A. **Controle** apresentando todas as fases do desenvolvimento ovocitário (**Fase I a V**). B. Concentração de **50 PC**, visível apenas **Fase III** e **VCA** - Vitelogenia Completa Avançada). C. Concentração de **50 PA** visível a **Fases III e IV**, predominando a **Fase V** e **VCA** -Vitelogenia Completa Avançada e área com oócitos atresícos (**OA**). D. Concentração de **500 PA**, observa-se as **Fase IV** e **VCA** Vitelogenia Completa Avançada (**VCA**).

5.6.5.2. Fator de Impacto (FI)

Nas análises do Fator de Impacto (**FI**) foram estipulados pesos quantitativos às alterações qualitativas, segundo as observações nas lâminas, sendo que a primeira alteração observada nas lâminas foram a ausência de uma das fases de desenvolvimento oocitário. Após essa observação, outra alteração foi a vitelogênia completa avançada (**VCA**) e, após essas alterações, outras alteração foram a presença de oócitos atrésicos (**OA**) ou basófilos atípicos (**BA**).

Fator de Impacto (FI):

Ausência de uma das fases de desenvolvimento

Presença de Vitelogênia Completa Avançada (**VCA**)

Presença de Oócitos Atrésicos (**OA**) ou Basófilos Atípicos (**BA**)

Para os cálculos, o número de lâminas (dados quantitativos) foram somados ao número de alterações observadas (dados qualitativos).

Cálculo:

A + B = C, sendo:

A = número de lâminas observadas em cada fase para cada peixe

B = alterações encontradas como:

ausência de uma das fases de desenvolvimento dos oócitos + presença de VCA + Presença de AO ou BA

C = valor total

Tabela 7. Número de lâminas que apresentaram alterações - Ausência de uma das fases de desenvolvimento oocitário.

Ausência de uma das fases de desenvolvimento oocitário					
Fases das Lâminas	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	5	5	5	5
Intermediário	5	5	5	5	5
Final	5	5	5	5	5
Total	15	15	15	15	15

Tabela 8. Número de lâminas que apresentaram alterações – Vitelogenia Completa Avançada (VCA)

Vitelogenia Completa Avançada					
Fases das Lâminas	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	4	5	5	4
Intermediário	5	5	3	4	5
Final	4	5	4	4	4
Total	14	14	12	13	13

Tabela 9. Soma das alterações observadas: (Tabela 7 + Tabela 8)

Soma de total as alterações (tabela 7 + tabela 8)						
Fases das Lâminas	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5	Total
Inicial	10	9	10	10	9	48
Intermediário	10	10	8	9	10	47
Final	9	10	9	9	9	46
Total	29	29	27	28	28	141

Concentração 50 PA

Tabela 10. Número de lâminas que apresentaram alterações - Ausência de uma das fases de desenvolvimento oocitário.

Fases das Lâminas	Ausência de uma das fases de desenvolvimento oocitário				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	5	5	5	5
Intermediário	5	5	5	5	5
Final	5	5	5	5	5
Total	15	15	15	15	15

Tabela 11. Número de lâminas que apresentaram alterações – Vitelogenia Completa Avançada (VCA)

Fases das Lâminas	Vitelogenia Completa Avançada				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	5	5	5	5
Intermediário	5	4	5	5	4
Final	4	5	4	5	4
Total	14	14	14	15	13

Tabela 12. Número de lâminas que apresentaram alterações – oócitos atrésicos

Fases das Lâminas	Oócitos atrésicos				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	4	3	0	0	0
Intermediário	3	2	0	0	4
Final	0	3	0	0	2
Total	7	8	0	0	6

Tabela 13. Soma das alterações observadas (Tabela 10 + Tabela 11 + Tabela 12)

Fases das Lâminas	Soma das alterações observadas (tabela 10 + tabela 11 + tabela 12)					
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5	Total
Inicial	14	13	10	10	10	57
Intermediário	13	11	10	10	13	57
Final	9	13	9	10	11	52
Total	36	37	29	30	34	166

Concentração 500 PA**Tabela 14.** Número de lâminas que apresentaram alterações - Ausência de uma das fases de desenvolvimento oocitário.

Fases das Lâminas	Ausência de uma das fases de desenvolvimento oocitário				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	5	5	5	5
Intermediário	5	5	5	5	5
Final	5	5	5	5	5
Total	15	15	15	15	15

Tabela 15. Número de lâminas que apresentaram alterações – Vitelogenia Completa Avançada (VCA)

Fases das Lâminas	Vitelogenia Completa Avançada				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	5	5	5	5
Intermediário	5	5	5	5	5
Final	5	5	5	5	5
Total	15	15	15	15	15

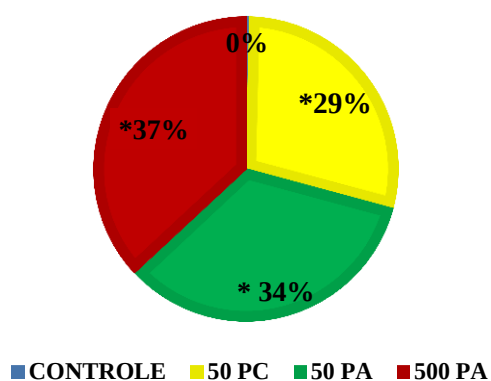
Tabela 16. Número de lâminas que apresentaram alterações – oócitos atrésicos, folículos atrésicos ou basofilia atípica)

Fases das Lâminas	Alterações: Oócitos atrésicos ou Folículos atrésicos ou Basófilos atípicos				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	3	4	0	0	0
Intermediário	3	2	5	4	4
Final	0	2	1	1	2
Total	6	8	6	5	6

Tabela 17. Soma das alterações observadas (Tabela 12 + Tabela 13 + Tabela 14)

Fases das Lâminas	Soma das tabelas					Total
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5	
Inicial	13	14	10	10	10	57
Intermediário	13	12	15	14	14	68
Final	10	12	11	11	12	56
Total	36	38	36	35	36	181

Figura 17. Fator de impacto nas gônadas analisadas no controle e nos ensaios com os corantes (em %) e análise de variância entre o controle e os ensaios com os corantes * ≤ 0.05

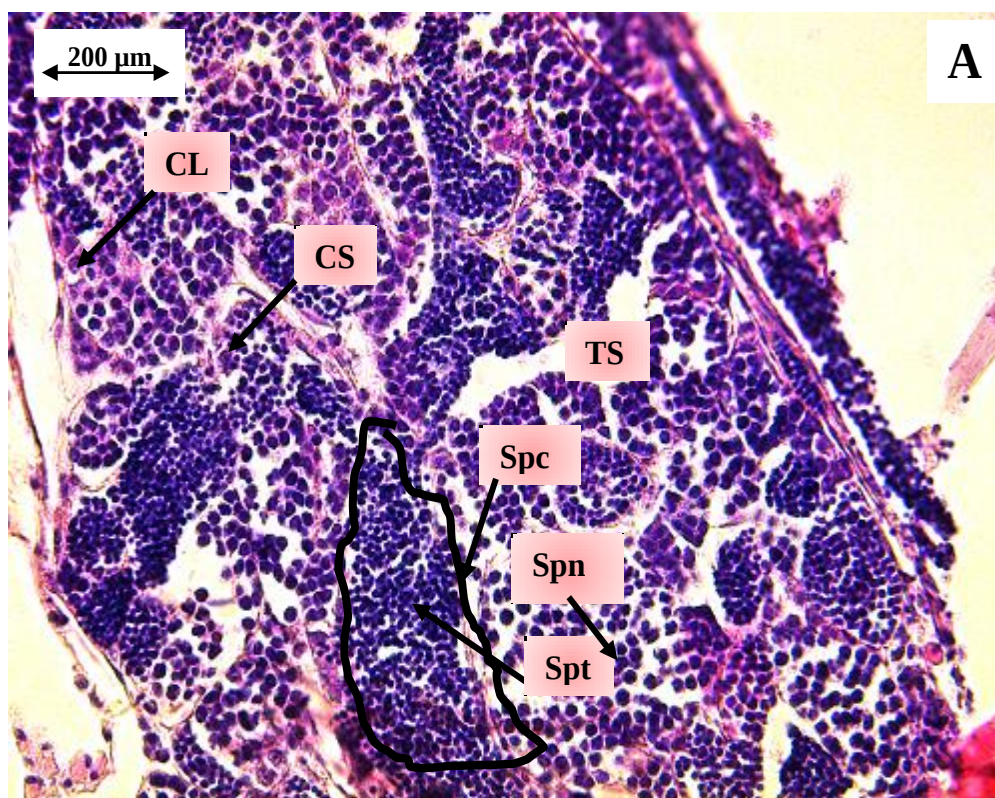


5.6.6. Análises qualitativas das gônadas masculinas

5.6.6.1. Gônadas masculinas – Controle

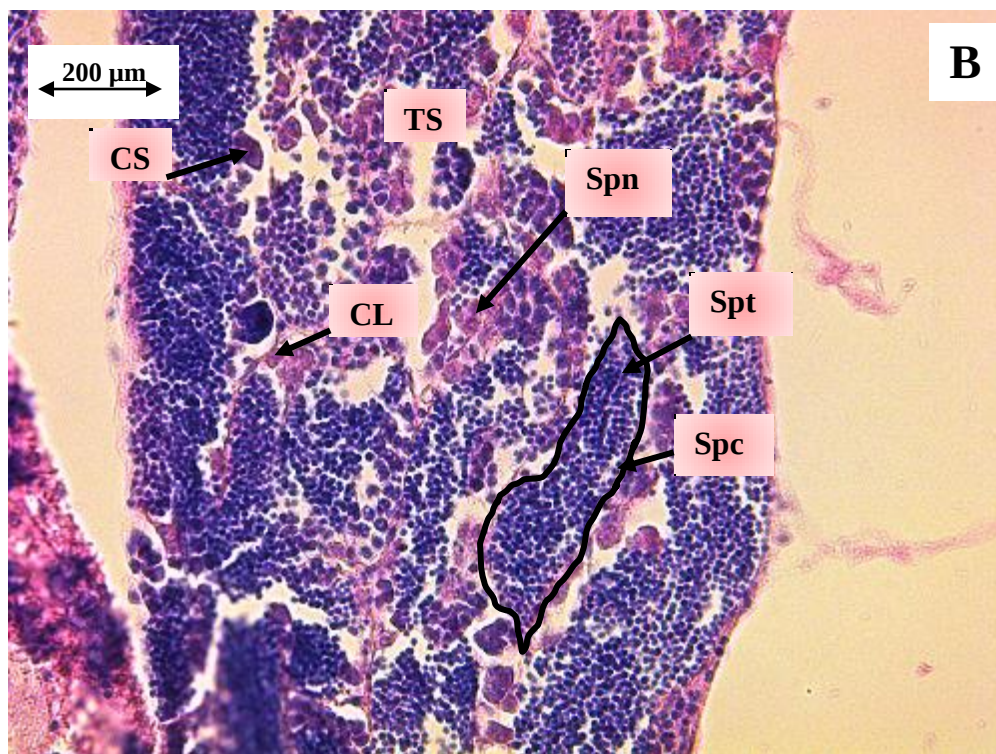
A análise histológica gonadal do controle mostra um padrão normal de desenvolvimento ovocitário com todas as fases de desenvolvimento das células germinativas (fase inicial de diferenciação onde ocorrem sucessivas divisões mitóticas chamadas espermatogônia); fase secundária com divisões meióticas responsáveis pela formação dos espermatócitos e espermatídes e a fase final de diferenciação das espermatídes em espermatozoides, além da presença das células de Leydig responsáveis pela produção de hormônios esteróides em peixes (Nóbrega *et al.* 2009) e células de Sertoli, que facilitam a sobrevivência e desenvolvimento das células germinativas de modo que a espermatogênese possa fornecer células suficientes para garantir a fertilidade (Schulz *et al.*, 2015), assim como apresenta cistos em pleno desenvolvimento, compondo as células somáticas do testículo (Figuras 18 e 19).

Figuras 18 e 19. Corte histológico de gônadas masculinas de *D. rerio* - controle do ensaio com o corante amarelo tartrazina de 21 dias.



Fonte: Acervo pessoal

Legenda: A. Espermatogonia (Spn); Espermatocistos (Spc); Espermatócitos (Spt); Espermatogonia (Spn); Células de Sertoli (CS); Células de Leydig (CL); Túbulos seminíferos (TS). Coloração (HE).



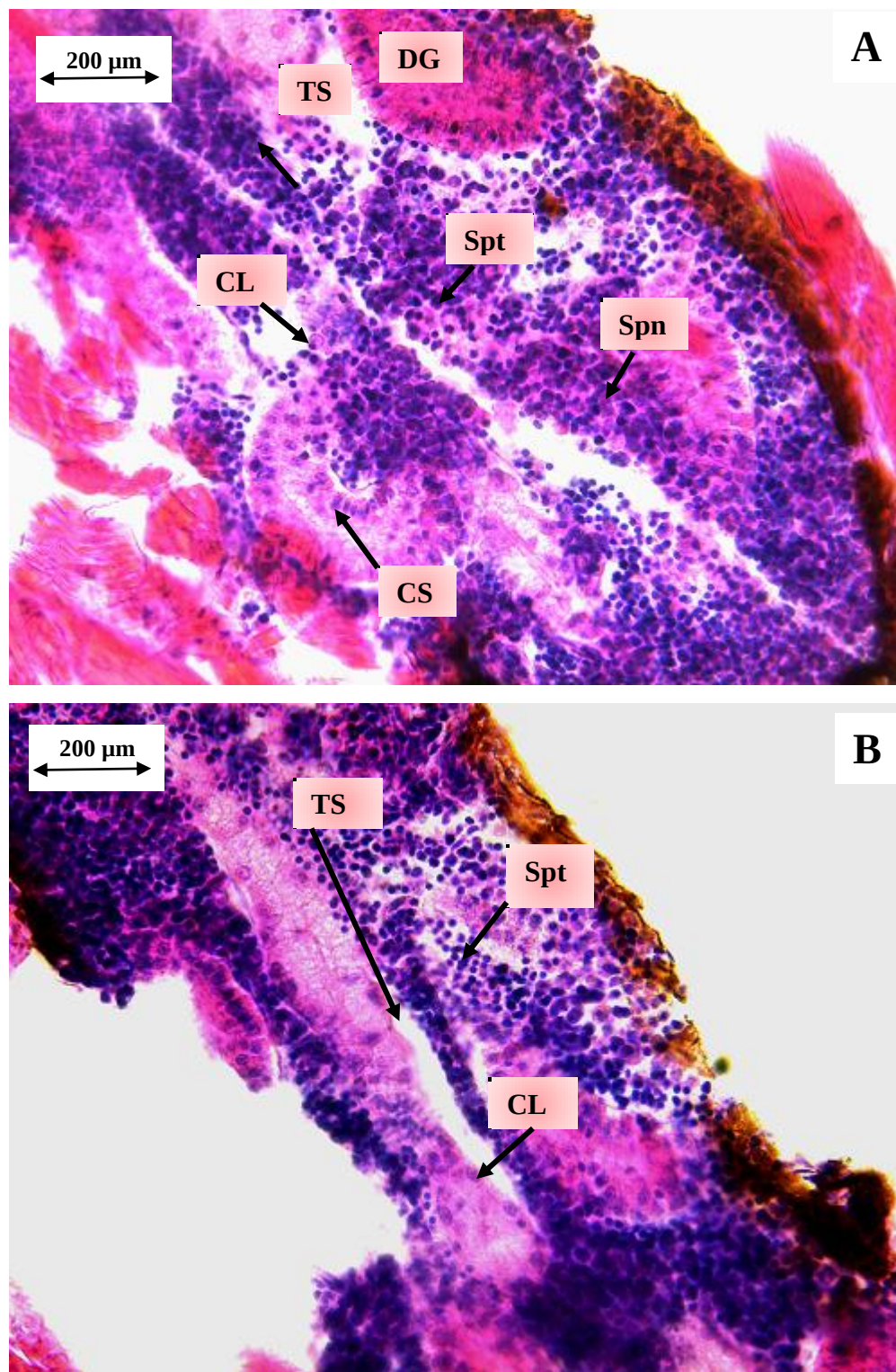
Fonte: Acervo pessoal

Legenda: B. Espermatogonia (**Spn**); Espermatocistos (**Spc**); Espermatócitos (**Spt**); Espermatogonia (**Spn**); Células de Sertoli (**CS**); Células de Leydig (**CL**); Túbulos seminíferos (**TS**). Coloração (HE).

5.6.6.2. Gônadas masculinas 50 PC

Nos ensaios do corante 50 mg.L⁻¹ PC, observa-se ausência de espermatocistos, com espermatócitos espalhados; regiões de degeneração, poucas células de Sertoli. (Figuras 20 e 21).

Figuras 20 e 21. Corte histológico de gônadas masculinas de *D. rerio*, 50 PC do ensaio crônico com o corante amarelo tartrazina.



Fonte: Acervo pessoal

Legenda: A e B. Espermatogonia (Spn); Espermatócito (Spt); Células de Leydig (CL); Células de Sertoli (CS); Túbulos seminíferos (TS); Degeneração gonadal (DG); Coloração HE.

5.6.6.3. Gônadas masculinas - 50 PA

Na concentração de 50 PA, destacam-se numerosas e globulares células de Sertoli por todo o campo do testículo e presença de região de degeneração (Figuras 22 e 23).

Figuras 22 e 23. Corte histológico de gônadas masculinas de *D. rerio*, 50 PA do ensaio crônico com o corante amarelo tartrazina.

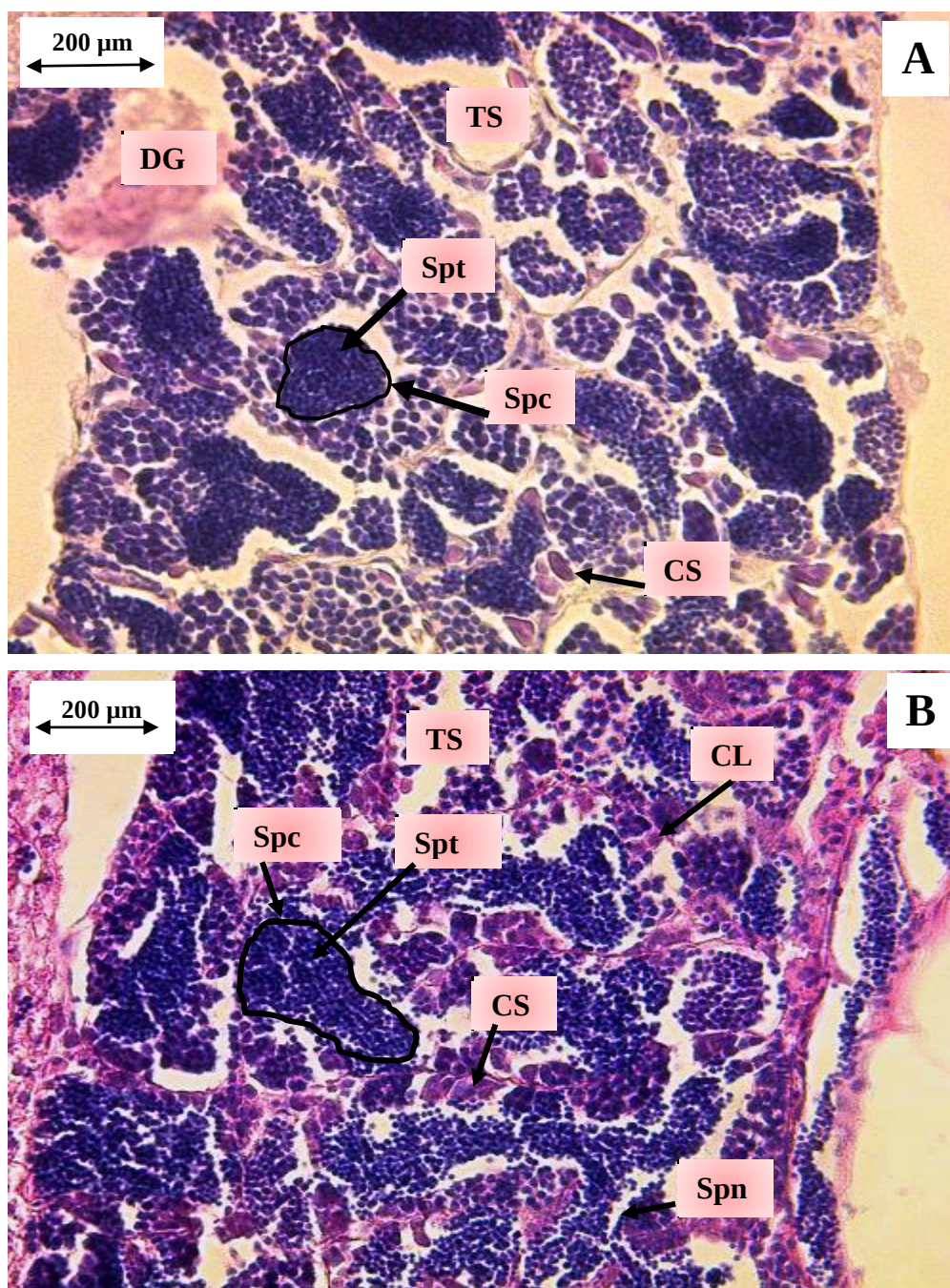


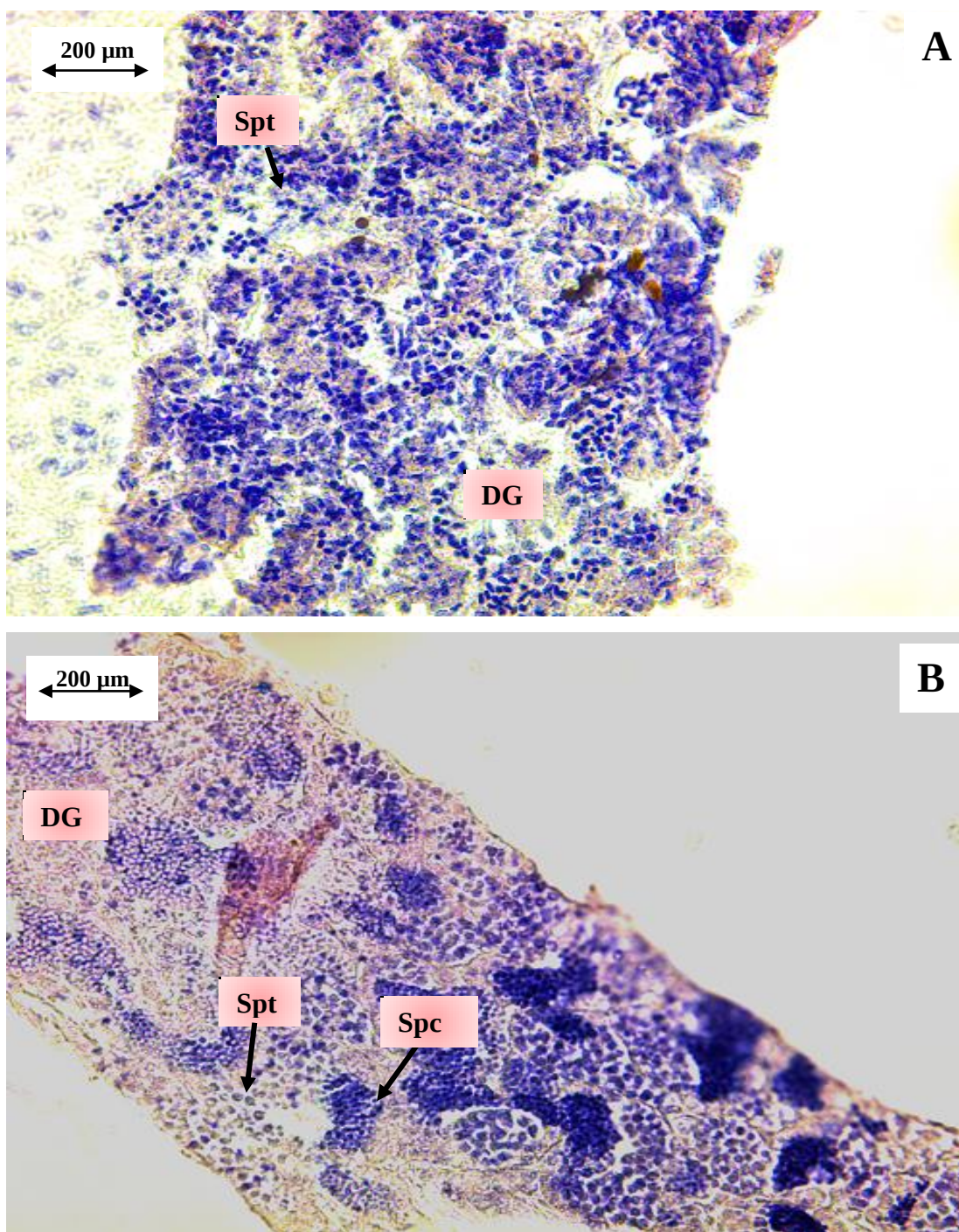
Foto: Acervo pessoal

Legenda: A e B. Espermatogonia (Spn); Espermatócitos (Spt); Espermatocitos (Spc); Células de Leydig (CL); Células de Sertoli (CS); Túbulos seminíferos (TS); Degeneração gonadal (DG). Coloração HE.

5.6.6.4. Gônadas masculinas – 500 PA

Observa-se grande região de degeneração; ausência dos espermatocistos; espermatócitos espalhados; não visualizada as células de Sertoli e de Leydig (Figuras 24 e 25).

Figuras 24 e 25. Corte histológico de gônadas masculinas de *D. rerio*, 50 PA do ensaio crônico com o corante amarelo tartrazina.



Fonte: Acervo pessoal

Legenda: A e B. Espermatócito (Spt); Espermatocistos (Spc); Degeneração Gonadal (DG). Coloração HE.

5.6.7. Análises Quali - Quantitativas das Alterações nas Gônadas Masculinas

5.6.7.1. Presença/Ausência das fases de desenvolvimento espermático

Na concentração de 50 PC, 17%, em todos os peixes, não apresentaram os espermatocistos (**Spd**); na concentração de 50 PA, não houve ausência de fases no desenvolvimento gonodal; na concentração de 500 PA, nas fases de desenvolvimento observamos em 17% a ausência de espermatocistos e em 50%, além da ausência de espermatocistos, não observamos células de Sertoli (**CS**) e células de Leydig (**CL**) (Tabela 18).

Tabela 18. Fases do desenvolvimento dos oócitos das gônadas masculinas. O campo marcado representa a ausência de uma das fases (50 PC; 50 PA e 500 PA).

Peixes Oócitos	Controle					50 PC					50 PA					500 PA				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
Espermatogônias																				
Espermatócitos(Spt)																				
Espermatocistos																				
Células de Leydig																				
Células de Sertoli																				
Ducto espermático																				
Total (%)	0	0	0	0	0	17	17	17	17	17	0	0	0	0	0	17	50	50	50	50

P1 a P5 = Peixes de 1 a 5

■ Presença de alterações dos oócitos nas gônadas masculinas.

5.6.7.2. Fator de Impacto (FI)

Para análise do Fator de Impacto (FI), primeiro foram analisadas as lâminas que apresentaram ausência em uma das fases de desenvolvimento oocitário e depois as lâminas que apresentaram alterações.

Fator de Impacto (FI):

Ausência de uma das fases do desenvolvimento da espermatogênese.
Alterações/ausência células de Leydig, células de Sertoli e Degeneração Gonadal

Concentração 50 PC

Tabela 19. Número de lâminas que apresentaram ausência de Espermatocistos.

Fases das Lâminas	Ausência de Espermatocistos				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	4	4	5	5
Intermediário	4	3	3	3	4
Final	3	5	5	5	3
Total	12	12	12	13	12

Tabela 20. Número de lâminas que apresentaram alterações nas células de Sertoli e Degeneração gonadal.

Fases das Lâminas	Alterações nas células de Sertoli e Degeneração gonadal				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	4	5	5	4
Intermediário	5	3	2	3	3
Final	3	5	3	4	2
Total	13	12	10	12	9

Tabela 21. Soma das alterações observadas (Tabela 19 + Tabela 20).

Fases das Lâminas	Soma das Alterações (tabela 16 + tabela 17)					
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5	Total
Inicial	10	8	9	10	9	46
Intermediário	9	6	5	6	7	33
Final	6	10	8	9	5	38
Total	25	24	22	25	21	117

Concentração 50 PA

A concentração de 50 PA não apresentou ausência nas fases de desenvolvimento das gônadas masculinas, apenas alterações nas células de Sertoli e Degeneração Gonodal (Tabela 22)

Tabela 22. Número de lâminas que apresentaram alterações nas células de Sertoli e Degeneração gonodal.

Fases das Lâminas	Alterações nas células de Sertoli e Degeneração gonodal					
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5	Total
Inicial	4	4	5	5	3	21
Intermediário	3	5	2	3	3	16
Final	3	5	4	2	2	16
Total	10	14	11	10	8	53

Concentração 500 PA**Tabela 23.** Número de lâminas que apresentaram ausência de Espermatocistos

Fases das Lâminas	Ausência de Espermatocistos				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	5	4	5	5	4
Intermediário	4	4	5	5	5
Final	4	5	4	5	5
Total	13	13	14	15	14

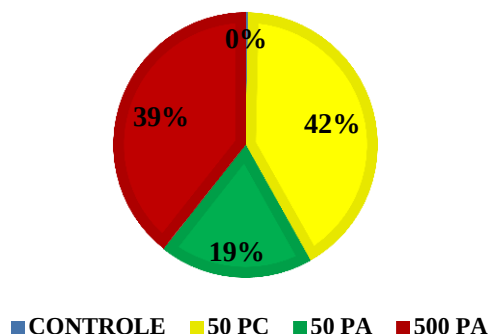
Tabela 24. Número de lâminas que apresentaram alterações nas Células de Sertoli e Células de Leydig.

Fases das Lâminas	Alterações nas células de Sertoli e células de Lydig				
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5
Inicial	4	3	2	4	2
Intermediário	3	4	1	2	3
Final	2	3	3	3	3
Total	15	15	15	15	15

Tabela 25. Total de alterações (Tabela 23 + Tabela 24)

Fases das Lâminas	Soma das Alterações (tabela 16 + tabela 17)					
	Peixe 1	Peixe 2	Peixe 3	Peixe 4	Peixe 5	Total
Inicial	9	7	7	9	6	38
Intermediário	7	8	6	7	8	36
Final	6	8	7	8	8	37
Total	22	23	20	24	22	111

Figura 26. Fator de impacto nas gônadas analisadas no controle e nos ensaios com os corantes (em %) e análise de variância entre o controle e os ensaios com os corantes * ≤ 0.05



5.7. Discussão

As duas concentrações do corante amarelo tartrazina, nos dois padrões do corante causaram alterações morfológicas nas gônadas femininas e masculinas. Nas gônadas femininas, as alterações foram principalmente a ausência das primeiras fases de desenvolvimento ovocitário, com proeminência do desenvolvimento da última fase, vitelogenia completa, seguida de vitelogenia completa avançada, além de oócitos atrésicos, folículos atrésicos e basofilia atípica observada na concentração de 500 PA. Nas gônadas masculinas, as alterações foram a ausência de espermatocistos, ausência ou alterações nas células de Sertoli ou de Leydig e degeneração gonadal.

Essas alterações foram avaliadas também quantitativamente, e porcentagens patológicas refletiram a gravidade das lesões nas gônadas.

Foi determinado um fator de impacto (FI), um índice patológico das morfologias observadas nas gônadas, através das contagens de lâminas com cortes alterdos para avaliar a gravidade das lesões nos ovários e testículos, indicando o estado de saúde reprodutivo do organismo em uma condição ambiental alterada. Este método de pontuação permitiu identificar melhor o impacto do corante, em termos percentuais relacioná-lo a capacidade reprodutiva.

A diminuição ou ausência na proporção de fases iniciais de maturação gonadal, que funcionam como células de reservas no caso de espécies com reprodução contínua, constituem ameaça ao processo reprodutivo da espécie. Quantitativamente, neste trabalho, as ausências das fases iniciais do desenvolvimento das gônadas femininas e a ausência de espermatocistos foram observados em todos os cortes histológicos.

Fases avançadas de vitelogenia e ausência de espermatocistos refletiram no número elevado de ovos nas reproduções de *D. rerio*, principalmente na concentração do padrão puro (500 PA), de onde obteve-se 100% a mais de ovos que no controle.

A degeneração em oócitos atrésicos pode ocorrer em dois momentos assíncronos, antes da desova, quando os oócitos não alcançaram a maturidade e após a desova, naqueles que deixaram de ser eliminados (Chouchene, 2011). No entanto a atresia nas fases posteriores, pode indicar uma condição patológica e tem sido associada a exposição com contaminantes ambientais (Chouchene, 2011). Folículos atrésicos foram observados em organismos expostos a vários contaminantes ambientais (Mendez, 2012).

Foi verificado que a exposição de *Danio rerio* a hormônios aumenta a taxa de atresia na gônada (Silva et al., 2012). A atresia folicular é um processo degenerativo hormonalmente controlado no qual os folículos perdem a sua integridade e são reabsorvidos antes da ovulação (Santos et al., 2008). Nesse processo, ocorre a desorganização do núcleo e do citoplasma do ovócito, em condições ambientais a incidência de folículos atrésicos está relacionado a nutrição insuficiente e a exposição a contaminantes, resultando em uma diminuição da capacidade reprodutiva (Santos et al., 2008). Portanto, para hormônios, a atresia folicular é um biomarcador histopatológico. No entanto, para corantes não há estudos histológicos. Nesta pesquisa, apesar do número de ovos das concentrações de corante serem maiores que no controle, a qualidade desses ovos foi afetada.

Em organismos aquáticos, os órgãos expostos a contaminantes afetaram o comportamento das espécies. Bernardi, et al., (2018) estudaram comportamentos em *D. rerio*, como sinal precoce de toxicidade por exposição aguda ao cádmio, comprovando que os *D. rerio* podem alterar o seu comportamento e intensificar sua reprodução.

Os efeitos do corante amarelo tartrazina sobre embriões e larvas de *D. rerio* comprovaram que o corante afetou seu desenvolvimento. Outros estudos com as fases embrionárias foram realizados por Joshi & Pancharatna (2017); Linskens, (2018); Gupta et al., (2019); Jiang et al., (2019); Silva & Fracácio (2020, no prelo) e corroboram essa toxicidade.

Este trabalho histológico com corante azo é inédito e apesar dos trabalhos citados, há ainda muita carência de estudos ecotoxicológicos com o corante.

Moreira (2019) estudou a reprodução de *D. rerio* expostos aos corantes Índigo Blue e Índigo Natural, seguida de análises histológicas de gônadas masculinas e femininas obtendo elevado número de ovos após os ensaios de vinte e um dias. Na análise histológica, o autor observou que as fêmeas apresentaram predomínio de fases maduras nos dois corantes, mas os machos apresentaram predomínio de fases mais maduras de desenvolvimento gonadal (espermatozoides) somente no corante Índigo Blue.

Pesquisas com *D. rerio* indicam que a exposição a poluentes ambientais pode levar a anormalidades nos ovários e testículos. Molina et al., (2013) estudaram os efeitos do BPA (bisfenol propano), um desregulador endócrino que pode imitar hormônios e que pode ser incorporado aos alimentos. Eles constataram múltiplas alterações nos ovários de *D. rerio*, destacando-se a vacuolização do citoplasma folicular, grande degeneração de todos os componentes celulares e um aumento importante na porcentagem de folículos atréticos nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g/L}^{-1}$. Meiyan et al., (2016) demonstraram que exposição ao fluoreto afetou significativamente o desenvolvimento ovariano, diminuiu os hormônios reprodutivos, afetou a oogênese, induziu o estresse oxidativo e causou apoptose por vias extrínsecas e intrínsecas no ovário do *D. rerio*.

Correa (2016) expôs *D. rerio* ao pesticida Chlorantraniliprole a 0,60 $\mu\text{g/L}^{-1}$ por 14 e 21 dias, observando um predomínio de oócitos com vitelogênese lipídica e protéica e oócitos com vitelogênese completa. Foi observado também a presença de muitos grânulos de vitelo acidófilos colados, compondo uma massa única homogênea e coalescente ocupando boa parte do citoplasma; em machos observou hipertrofia e degeneração em células gaméticas, especialmente em espermatócitos, além de degeneração hipertrófica dos hepatócitos nos tecidos do fígado.

Em cádmio, nas concentrações de $1 \mu\text{g de Cd/L}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g de Cd/L}^{-1}$ e zinco, nas concentrações de $180 \mu\text{g de Zn/L}^{-1}$ e $120 \mu\text{g de Zn/L}$ (valores permitidos pelas legislações em ambientes aquáticos), Alkimin (2016) observou alterações histológicas pronunciadas em gônadas e em fígado de fêmeas. Gônadas de machos apresentaram alterações pontuais e fígados apresentaram lesões que podem comprometer o funcionamento do órgão, comprovando que esses valores, permitidos pelas legislações são capazes de provocar efeitos endócrinos em machos e fêmeas de *D. rerio*.

Desta forma, o estudo histológico é um bom indicador da toxicidade das substâncias. Nesse estudo as alterações encontradas nas gônadas femininas, como vitelogenia completa avançada e masculinas, como ausência de espermátócitos, corroboraram com o que se observou nas reproduções, que apresentaram elevado número de ovos.

Houve correlação positiva entre o número de ovos e os elementos ferro, fósforo, potássio e sódio em 0 hps e 24 hpf. O fósforo é um macromineral com função estrutural, o organismo necessita em grandes quantidades (McDowell, 1992); no aspecto sinérgico, o fósforo pode ser citado como participante do processo intermediário da formação da parede intestinal, na atividade das enzimas digestivas (Tacon, 1990). Em decorrência à sua essencialidade para o crescimento e para o metabolismo dos lipídios, o fósforo é o mineral de maior importância na nutrição animal. A maior quantidade de fósforo a ser metabolizado vem da alimentação (Moraes, et al., 2009).

O mineral ferro destaca-se, essencialmente, por sua participação em processo respiratório celular (NRC, 1993). No ambiente aquático, há baixa disponibilidade desse mineral, sendo a alimentação a fonte principal. (Barros et al., 2002) observaram que a ausência de ferro, juntamente com a vitamina C, propiciou o aparecimento de anemia microcítica e hipocrômica aos alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e níveis acima das exigências nutricionais descritas para a espécie não determinam efeito detrimental no desempenho produtivo.

O sódio é um mineral essencial para o organismo dos peixes sendo ele junto como o potássio responsável pelo balanço iônico nos fluidos do corpo do animal e é importante na absorção de nutrientes no trato digestório (Aguiar, 2018), participa de funções biológicas importantes, tais como o controle da pressão osmótica, equilíbrio ácido-básico, funcionamento da bomba sódio e potássio, na constituição do suco gástrico (Evans et al. 2005)

Quanto ao potássio, exerce função primordial no comportamento dos gametas, no caso das células espermáticas, elas são imóveis no testículo o que se deve a elevada concentração de potássio presente na célula, quando o esperma entra em contato com a água o potássio é diluído, e então os espermatozoides são ativados (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004).

Resíduos de corantes são facilmente lançados em rios, sistemas de tratamento de água não diminuem sua toxicidade (Oliveira et al., 2010), pelo contrário, dados na literatura mostram que os produtos clorados gerados pelo tratamento convencional da água podem ser mais tóxicos (Vacchi et al., 2013); vários compostos corantes podem ser cancerígenos (Iarc, 2010) e podem ser incorporados aos sedimentos como aminas aromáticas, mutagênicas e carcinogênicas (Zanoni and Yamanaka, 2017).

5.8. Conclusões

Este estudo mostrou que a exposição aos corantes, pode afetar o desenvolvimento sexual, prejudicando a histologia da gônada e induzir alterações histopatológicas graves em *D. rerio*, como ausência no desenvolvimento de fases no desenvolvimento oocitário, principalmente das fases iniciais; presença de vitelogenia completa avançada, oócitos atresiais e basófilos atípicos nas gônadas femininas e ausência de uma das fases no desenvolvimento de espermatogênese; alterações nas células de Leydig e de Sertoli e degeneração nas gônadas masculinas.

O corante amarelo tartrazina, tanto PA como PC, tiveram efeitos tóxicos aos biomarcadores (órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de *D. rerio*), desde a menor concentração (50 mg.L^{-1}) testada.

A exposição aos corantes induziu um aumento de vitelogenia nos ovários de fêmeas *D. rerio*.

Nos testículos, foram observadas fases sem espermatocistos, com espermatozoides dispersos nos testículos.

As porcentagens de alterações obtidas nos tecidos de gônadas femininas e masculinas refletiram a atuação do corante no estímulo exagerado à desova inicialmente e corroborando os dados quantitativos com predomínio de folículos nos estágios mais avançados de vitelogenia completa. As análises quali-quantitativas apresentaram alterações de 29 a 37% nos ovários e de 19% a 42% nos testículos. Portanto, o corante amarelo tartrazina, utilizado como aditivo alimentar, é prejudicial à perpetuação da espécie.

As condições histopatológicas dos ovários e testículos de *D. rerio* refletiram em sua reprodução, causando elevado número de ovos, porém com decréscimos consideráveis de larvas nas concentrações dos corantes testadas.

Referências

- ABNT NBR 15499:2015 Emenda 1:2016 · (Projeto: emenda ABNT NBR · 15499:2016). Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta. Rio de Janeiro. 2016.
- Aguiar, NC, (2018). Inclusão de cloreto de sódio (NaCl) na ração para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná. 57p.
- Akaishi, F. M., Silva, D.E. Assis, H. C., Jakobi, S. C. G., Eirasstofella, D. R., St-Jean, S. D., Courtenay, S. C., Lima, E. F., Wagener, A. L. R., Scofield, A. L., Oliveira Ribeiro, C. A.(2004). Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 46 (2): 244-253
- Albasher, G., Maashi, N., Alfarraj, S. Almeer, R., Albrahim, T., Alotibi, F., Bin-Jumah, M., Mahmoud, A. M., (2020). Perinatal Exposure to Tartrazine Triggers Oxidative Stress and Neurobehavioral Alterations in Mice Offspring. Antioxidants, 9 (53) doi: 10.3390/antiox9010053.
- Aleströn, P., Holter, J. L., Nourizadeh-Lillabadi, R., (2006). Zebrafish fish in functional genomics and aquatic biomedicine. Tendencies Biotechnol.24. Pp. 15-21.
- Alkimin G. D. (2016). Toxicidade de cádmio e zinco em *Danio rerio*: comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, UNESP, Sorocaba.
- Amin K. A., Hameid II A., Elsttar A. H. A., (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. Food and Chemical Toxicology, v.48, n.10, p. 2994–2999.
- APHA – American Public Health Association, (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington:APHA. 1360 pp.
- Armiliato, N. et al. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate (2014). Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, v. 77, n. 7, p. 405-414.
- Basu, A. & Kuma, G.S. (2016a) Studies on the interaction of the food colorant tartrazine with double stranded deoxyribonucleic acid, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 34:5, 935-942, DOI: 10.1080/07391102.2015.1057766
- Basu, A. & Kuma, G.S. (2016b). Multispectroscopic and calorimetric studies on the binding of the food colorant tartrazine with human hemoglobin. Journal of Hazardous Materials 318 (2016) 468–476.

Bernardi, M.M., Borges J. C. S., Santos, D. A., Figueiredo, D. A. L., Kirsten T.B., Silva, J.R.M.C., Sandini, T.M., (2018). O comportamento como um sinal precoce de toxicidade e lesões no sistema respiratório induzidas por cádmio em zebrafish. Atas de Saúde Ambiental, Vol 6.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases, 22, 1: 25-34.

Chouchene, L., Banni, M., Kerkeni, A., Said, K., Messoudi, I., (2011). Cadmium-induced ovarian pathophysiology is mediated by change in gene expression pattern of zinc transporters in zebrafish (*Danio rerio*). Chem Biol Interact. Sep 5;193(2).

Chung, K. T. (2016). Azo dyes and human health: a review. Journal of Environmental Science and Health, Londres, parte C, v. 34, n. 4, p. 233-261, out. 2016.

CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução n.44/77 de 25 de novembro de 1977. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/44_77.htm>. Acesso em: 29 jun. 2017.

Connolly, M. H. et al. 2014. Temporal dynamics of oocyte growth and vitellogenin gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). Zebrafish, v. 11, n. 2, p. 107-114, 2014.

Côrrea, C.E.S.(2016). Aspectos histológicos de gônadas e fígado de *Danio rerio* como potenciais biomarcadores indicativos de atuação de interferentes endócrinos do pesticida clorantianiliprole. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. UNESP. 109p. 2016

Costa, A. M. 2004. Análise histológica de gônadas de Carapau (*Trachurus trachurus Linnaeus*): morfogênese e escala de maturação. Relat. Cient. Técn IPIMAR, série digital, no. 16, p. 17.

Costache, A. D. et al. (2005). Homology-modeled ligand-binding domains of zebrafish estrogen receptors α , $\beta 1$, and $\beta 2$: from *in silico* to *in vivo* studies of estrogen interactions in *Danio rerio* as a model system. Molecular Endocrinology, v. 19, n. 12, p. 2979-2990, 2005.

Dai, Y.J., Jia, Y. F., Chen, N., Bian, W. P., Li, Q. K. Ma, Y. L. Chen, D. S. (2014). Zebrafish as a model system to study toxicology. Environ. Toxicol. Chem., 33, pp 11-17.

Del Giovine L., Bocca A. P. (2003) Determination of synthetic dyes in ice cream by capillary electrophoresis. Food Control, v.14, p.131-135.

Dietrich, D. R; Krieger, H.O., (2009). Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small laboratory Fish. Published by John Wiley & Sons, INC., Hoboken, New Jersey.

Domingues, D. F.; Bertolleti, E.2006. Seleção, cultivo e manutenção de organismos aquáticos. In: Zagatto, P. A.; Bertolleti, E. (eds). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos RiMa editora. p. 153 – 184, Cap. 7.

Dynatech Indústrias Químicas Ltda. Ficha de informações de segurança de produto químico nº Dynac-006 corante amarelo tartrazina. Informe técnico amarelo Dynacid G. CR.E09.0002 São Paulo, 2016. (adquirido pessoalmente com a empresa em 22/09/2017).

Elbanna, K. et al. (2007). Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, Taiwan, v. 25, p. 667-680.

El-Sakhawy, M. A.; 1 & Dina W Mohamed, D.W.1 & Yasmine H. Ahmed, Y. H. (2019). Histological and immunohistochemical evaluation of the effect of tartrazine on the cerebellum, submandibular glands, and kidneys of adult male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research* (2019) 26:9574–9584 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04399-5>

EPA US – United States Environmental Protection Agency. (1992). Method 3010A: Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts for Total Metals for Analysis by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FLAA) or Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICP), 1 st edn. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Evans, D.H.; Permarini, P.M.; Choe, K.P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, v.85, p.97-177.

Ghonimi W.A., Elbaz A. (2015). Histological changes of selected Westar rat tissues following the ingestion of tartrazine with special emphasis on the protective effect of royal jelly and cod liver oil. *J Cytol Histol.* 6:346.

Gupta, R.; Ranjan, S.; Yadav, A; Verma, B.,; Malhotra, K.; Madan, M.; Ojasvi Chopra, O.; Jain, S.; Gupta, S.; Joshi, A.; Bhasin, C.; Mudgal, P. (2019). Toxic Effects of Food Colorants Erythrosine and Tartrazine on Zebrafish Embryo Development. *Current Research in Nutrition and Food Science*. Vol. 07, No. (3): Pg. 876-885.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.*, 86, pp 6-19.

IARC – International Agency for Research on Cancer. (Ed.) .Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Volume 100F – A Review of Human Carcinogenics. Disponível em: monographs.iarc.fr/Vol100F. Acesso 25/9/2020.

International Agency for Research on Cancer – IARC/WHO (2017). Benzidina. [www.iarc. Fr](http://www.iarc.fr). Acesso 02/07/20

Jiang et al (2020). Toxicity Assessment of 4 Azo Dyes in Zebrafish Embryos. *International Journal of Toxicology*, 2020; Vol. 39(2) 115-123.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES – JECFA (2012) Laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) nº 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. COMMISSION REGULATION (EU) No 231/2012 of 9 March 2012. *Official Journal of the European Union*, L 83/1, 22.3.

- Joshi V & Pancharatna K. (2017), Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. International Journal of Toxicology 37(1): 38-44.
- Khayyat L., Essawy A., Sorour J., Soffar A. (2017) Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects *in vivo*. Peer J 5:3041-3055.
- Knie, J. L.; Lopes, E. W. (2004). Ecotoxicological tests: methods, techniques and applications. FATMA/GTZ.
- Linskens A. (2018) The Long Term Effects of Tartrazine (FD&C Yellow No. 5) on Learning, Cognitive Flexibility, and Memory of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos into Adulthood, 2018. Disponível em people.uwm.edu (acesso 7/3/2020).
- Luzio, A., Monteiro, S. M., Rocha, E., António A. Fontainhas-Fernandes, A. A., Coimbra, A. M. (2016). Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17-ethinylestradiol and fadrozole). Aquatic Toxicology 175:90-105.
- Maack, G.; Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. Journal of Fish Biology 62, 895-906.
- Marmitt, S; Pirotta, L. V.; Stülp, S. (2010). Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. Química Nova, v. 33, n. 2, p. 384-388, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pqn/v33n2/27.pdf>>. Acesso em: 02. Mar. 2018
- McDowell, L. R. (1992). Minerals in Animal and Human Nutrition, Academic Press: London.
- Meiyan, L., Jinling, C., Chen, J., Sing, J., Zhou, B., Feng, C., Wang, J. (2016). Exposure to fluoride in water changed the structures of steroid-related gene exposures in adult zebra fish gonads. Chemosphere, v145, p 365-375.
- Mendez, F.M.N. (2012). Estudo dos efeitos dos elementos traços presentes nas partículas provenientes da queima do diesel no sistema reprodutivo de *Danio rerio* (zebrafish): análise morfológica e histológica. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências. 87p.
- Molina, A. M.; Lora A.J., Blanco, A., Monterde, J. G., Ayala, N., Moyano, R. (2013). Endocrine-active compound evaluation: qualitative and quantitative histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-A exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf., 88. P 155-162.
- Moraes, P.M., Loureiro, V. R., Padilha, P. M. (2009). Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. Quim. Nova, Vol. 32, No. 4, 923-927.
- Moreira, S. C. (2019). Aspectos ecotoxicológicos do corante índigo sintético e natural – com organismos teste *D. rerio* e *R. subcapitata*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. 97p. 2019.

Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T. (2010). Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48:2934-2944.

Nóbrega, R.; Batlouni, S.; França, L., (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 197-206.

OECD (2010). Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads. Paris: 87.

OECD- Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance for Test on Chemicals Section 2: Effects of Biotic Systems – Test no 236 - Fish Embryo Toxicity (FET) Test. Paris: OECD, 2013.

Oliveira, G. A. R. et al., (2010). Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. v.703, n.2, p. 200-208.

Ostroski, I.; Baricatti, R. A.; Lindino, C. A. (2005). Estabilidade dos corantes Tartrazina e Amarelo Crepúsculo. *Acta Sci. Technol.*, v. 27, n. 2, p. 101 – 106, 2005.

Santos, M.M., Micael, M., Carvalho, A.P., Morabito, R., Booy, P., Massanisso, P., Lamoree, M., Reis-Henriques, M.A., 2006. Estrogens counteract the masculinizing effect of tributyltin in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 151–155.

Schultz, Y.D.; Favaro, L.F.; Spach, H.L. (2002). Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Revist. Bras. Zool.*, n.19, p. 65-76.

Schulz, R. W. et al. (2015). Endocrine and paracrine regulation of zebrafish spermatogenesis: the Sertoli cell perspective. *Anim. Reprod.*, v.12, n.1, p.81-87.

Shore, J. (2002). Colorants and auxiliaries: organic chemistry and application properties. Vol.1 2.ed. Bradford: Society of Dyers and Colorists.

Silva, J & Fracácio, R (2020). Toxicity of yellow tartrazine dye on *Danio rerio* larvae after a multi-generation exposure (no prelo).

Silva, P., Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Malhão, F., Reis, B., Urbatzka, R., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., (2012). Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads-A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquat. Toxicol.* 124, 1–10.

Silva, L. M. J. (2016). Ciclo reprodutivo de fêmeas de *Devario aequipinnatus* (cypriniformes, cyprinidae) submetidas a diferentes temperaturas. Dissertação de mestrado em ciências da tecnologia animal. UNESP Ilha solteira.

- Singh, R. L.; Singh, P. K.; Singh, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes –A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 104, p. 21-31, 2015.
- Sleiman, M; Vildoso, D; Ferronato, C; Chovelon, J. Photocatalytic degradation of azo dye Metanil Yellow: Optimization and kinetic modeling using a chemometric approach. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 77, n. 1-2, p. 1-11, 2007.
- Soares, B. M. S., Araújo, T. M. T., Ramos J. A. B., Pinto L. C., Khayat B. M., Bahia M. O., Montenegro, R. C., Burbano, R. M. R., Khayat A. S. (2015). Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer Research*, 35.
- Sugimura T. (1982). Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer* 49:1970-84.
- Tacon, A. G. J. (1990). *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. The Essential Nutrients*, Argent Laboratories Press: Washington, vol. 1.
- Vacchi, F.I. (2013). Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. *Science of the total Environment*, v. 442, p.302-9.
- Van Der Ven, L.; Wester, P. *Histology and histopathology atlas of the zebrafish* (2003). Disponível em: < <http://zfishtoxpat.comoj.com//> >. Acesso em: 02/03/2020.
- Willey, J. B.; Krone, P. H. (2001). Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, v. 54, n. 1–2, p. 113-123, 2001.
- Wilson, J. M.; Bunte, R. M.; Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 48, n.6, p.785-789.
- Zaniboni-Filho, E.; Nuñez, A.P.O. (2004). Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo, p.45-73.
- Zanoni & Yamana, K. A. (2017). *Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento* / Org. Maria V. Boldrin Zanoni, Hideko Yamanaka. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica. 2017.
- Zanoni & Yamana K. A. (2017) *Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento* / Org. Maria V. Boldrin Zanoni, Hideko Yamanaka. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A questão principal dessa pesquisa foi responder se o corante alimentar amarelo tartrazina, considerado tóxico ao ser humano, por meio de muitas pesquisas com cobaias, poderia causar toxicidade para os organismos aquáticos, se lançados sem tratamento nos corpos hídricos, baseando-se também em poucas pesquisas ecotoxicológicas com o organismo *D. rerio*.

No primeiro capítulo, duas espécies distintas de cadeias tróficas diferentes, foram estudadas quanto a sua capacidade de reprodução e recuperação biológica, e apesar do corante ter estimulado as reproduções em algumas concentrações próximas utilizadas em produtos alimentares para a espécie humana, observamos o efeito de hormese (um estímulo em algumas concentrações, seguido de queda das mesmas nas concentrações seguintes). Para *D. similis*, houve uma ligeira recuperação na geração F1, no entanto, não foi expressiva para o tempo do ensaio e novas pesquisas para a espécie devem ser realizadas, num tempo maior de exposição ao corante.

As reproduções de *D. rerio* também foram estimuladas, refletindo-se no número de ovos postos, mas apresentaram quedas em sua viabilidade, ficando próximos ao controle e uma observação maior no desenvolvimento dos embriões, nos capítulos seguintes, corroboraram com a capacidade dos corantes estimularem alguns processos biológicos, pois houve eclosão dos ovos em 48 hpf (normalmente 72 hpf para a espécie) no entanto, embriões e larvas apresentaram deformidades letais e subletais.

Para *D. rerio* não houve recuperação biológica dos organismos, após um longo período de exposição e os organismos tiveram seu ciclo de vida reduzido.

Embriões e larvas sofreram deformidades no desenvolvimento, refletindo-se em alterações morfológicas letais e subletais, o que foi corroborado pelo tratamento histológico das gônadas femininas e masculinas, que apresentaram também, estímulo na última fase de desenvolvimento, mas ausência das primeiras fases gônadais, confirmando os efeitos observados nos ovos, embriões e larvas.

As análises quantitativas demonstraram que as gônadas femininas e masculinas sofreram muitas alterações à exposição crônica do corante por vinte e um dias, considerando-se qualitativamente, os cortes em etapas iniciais, intermediárias e finais das gônadas. As várias alterações, principalmente a ausência das primeiras fases de desenvolvimento dos oócitos levam a irreversibilidade da reprodução da espécie.

Em ensaios de recuperação biológica por três meses, após onze meses expostos ao corante, não foram suficientes para uma resposta satisfatória no quadro reprodutivo de *D. rerio*, levando-os a mortalidade e reduzindo seu ciclo vital de três anos para a metade do tempo, sem eficiência para a continuidade da espécie.

Os *endpoints* analisados em conjunto, confirmaram a toxicidade para os dois corantes, padrão puro e comercial.

O corante amarelo tartrazina possui toxicidade para os organismos aquáticos e seu uso deve ser melhor avaliado pelas indústrias de alimentos.

Quanto aos lançamentos, efluentes contendo os corantes, devem receber tratamento adequado e maior atenção deve ser dispensado às indústrias que o utilizam, assim como seu uso comercial deve receber maior atenção.

As legislações do setor alimentício devem avaliar melhor as quantidades aplicáveis para cada produto, para minimizar perdas dos corantes nos processos industriais, o que não vimos como preocupação dos órgãos desse setor.

As legislações ambientais devem enquadrar o uso de corantes à outras substâncias químicas consideradas tóxicas e cancerígenas para o ambiente e a população.

Sugestões para novos trabalhos:

Novos estudos podem ser efetuados para avaliar se os graus de alterações quantitativas nas gônadas de *D. rerio* (femininas e masculinas) podem ser reversíveis, testando os organismos em ensaios de biorremediação ou recuperação biológica em diversos tempos de exposição para situações posteriores mais adequadas.