



SOFIA COELHO MOREIRA

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DOS CORANTES ÍNDIGO
SINTÉTICO E NATURAL SOBRE A MICROALGA *RAPHIDOCELIS
SUBCAPITATA* E SOBRE O PEIXE *DANIO RERIO***

Sorocaba
2019



SOFIA COELHO MOREIRA

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DOS CORANTES ÍNDIGO
SINTÉTICO E NATURAL SOBRE A MICROALGA *RAPHIDOCELIS*
SUBCAPITATA E SOBRE O PEIXE *DANIO RERIO***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco

Sorocaba

2019

M838e	Moreira, Sofia Coelho Efeitos ecotoxicológicos dos corantes índigo sintético e natural sobre a microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> e sobre o peixe <i>Danio rerio</i> / Sofia Coelho Moreira. -- Sorocaba, 2019 99 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba Orientadora: Renata Fracácio Francisco 1. histologia. 2. zebrafish. 3. índigo blue. 4. Indigofera tinctoria. 5. algas. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: *Efeitos Ecotoxicológicos dos corantes indigo sintético e natural sobre a microalga Rhodospira rubra e sobre o peixe Danio rerio*

AUTORA: SOFIA COELHO MOREIRA

ORIENTADORA: RENATA FRACACIO FRANCISCO

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

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

Profª. Drª. EVELISE NUNES FRAGOSO DE MOURA
Hidrobiologia / CCBS, UFSCar, Campus São Carlos

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

Sorocaba, 18 de janeiro de 2019.

A minha mãe Valéria e a minha avó
Maria, amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e avó pela confiança e incentivo aos estudos durante toda minha jornada e sempre garantindo meu suporte material, energia e amor proporcionando uma vivência maravilhosa nesse planeta! Obrigada, vocês são duas fadas!

À minha orientadora Renata Fracácio, por toda ajuda, paciência, direcionamentos, conhecimentos e experiência, obrigada pela confiança e orientação ao longo do trabalho e pelas orientações de vida também!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, representado pelo Prof. Dr. José Arnaldo Roveda que sempre incentiva os alunos e é muito dedicado, obrigada pelas palavras de apoio professor.

Ao professor Dr. Paulo Tonello pela utilização do seu Laboratório, equipamentos e compreensão.

À Profa. Dra. Viviane Moschini Carlos, sua doutoranda Leila, por utilizar o microscópio invertido para preparo do inóculo e sua doutoranda Felícia pelo auxílio nas fotos da histologia.

À doutoranda Karen pelos dicas, conhecimento e ajudas!

À doutoranda e veterana querida e dedicada ao mundo da pesquisa, Cláudia Watanabe, obrigada pelos ensinamentos sobre algas, pelas amostras e empréstimo da câmera para contagem.

À 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.

Às técnicas do laboratório de biologia, solos e química do ICT – UNESP Sorocaba e Sandra Gavetti, Susan Lessa, Letícia Gonçalves.

Ao pessoal da portaria, sempre muito simpáticos, me salvando com os cafezinhos que me davam energia nos finais-de.semana na faculdade.

A todos os funcionários da faculdade que de alguma forma colaboraram.

Aos companheiros de turma de pós-graduação em especial os do LATHIS, Vivian por toda luz e conselhos, sem você eu teria o dobro de trabalho, Janete por toda a calma, ajuda e cuidado com os peixinhos, e Gláucia por toda confiança e aprendizado que pudemos ter ao acompanhar de perto seu trabalho.

Aos alunos de iniciação científica que participam das atividades do LATHIS na UNESP Sorocaba Stefany e Pablo em especial no mesmo projeto e aos demais Werbate, Samara, Bianca, Priscila e Natasha que compõe a equipe do laboratório.

A formanda Isadora Bertini, obrigada pelos momentos que passamos juntas com as alguinhas e por toda a ajuda!

As Repúblicas Cubaca e Magnatas, e a todos os amigos que tornaram esses dois anos muito agradáveis em meio a toda a pesquisa!

Aos pesquisadores de remédios pra doenças crônicas e organismos utilizados para estas pesquisas. Sem os remédios eu não teria, fisicamente falando, como fazer a pesquisa e obrigada ao convênio que cobre esses remédios!

A todos os pesquisadores que realizaram os estudos que consultei para aprender e realizar este trabalho!

As duas organizações que participo voluntariamente, “Fashion Revolution” e “Seu Lixo Meu” que me permitiram participar de ações de cunho sócio-ambiental que me deixam motivada e cheia de energia. Ajudando muito em especial nos momentos de espera de material, me tirando da agonia e me colocando em contato com muita gente boa nesse mundão!

E um agradecimento mais que especial à todos os zebrinhas que deram sua vida para esta pesquisa e por todas as alguinhas também, vocês são seres sensacionais e eu desejo continuar aprendendo com vocês!

A todos que de alguma maneira contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

A todos os recursos utilizados, sejam de caráter financeiro, de força de trabalho, energia ou simplesmente contribuindo com um sorriso ou uma palavra amiga que tornam tudo mais agradável!

Que Deus nos dê sabedoria para utilizarmos todo o conhecimento para fazer o bem!

“If night hides many secrets, indigo hides just as many”
Ousmane Gamame

MOREIRA, S. C. Aspectos ecotoxicológicos do corante índigo sintético e natural – com organismos teste *D. rerio* e *R. subcapitata*. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, UNESP. Univ Estadual Paulista, Sorocaba. 2019

RESUMO

A indústria têxtil é responsável pela maior parte de corantes utilizados comercialmente. Segundo a literatura estes contaminantes representam potencial tóxico a fauna aquática. Neste contexto destaca-se o corante sintético, Índigo Blue, por seu uso intenso no tingimento do “blue jeans”. Antes o corante índigo era obtido da planta *Indigofera tinctoria*, mas a viabilidade econômica sobrepôs a produção natural e tornou a cor azul acessível a sociedade com a produção sintética do corante. Este estudo objetivou comparar os aspectos ecotoxicológicos do corante Índigo Blue (sintético) e do corante Índigo Natural (obtido da planta *Indigofera tinctoria*) expondo-se organismos de dois níveis tróficos diferentes à 100 mg/L de cada corante (concentração representativa de corantes em efluentes têxteis). Os organismos-teste utilizados foram: 1) a alga *Raphidocelis subcapitata* com duração dos testes equivalente a 72h e 96h, avaliando-se o parâmetro crescimento pela contagem do número de células em relação ao grupo controle (a concentração estudada não inibiu o crescimento algal) e 2) o peixe *Danio rerio*, machos e fêmeas mantiveram-se expostos por 21 dias, num total de seis réplicas para cada tratamento e para cada sexo. Sendo 3 organismos-teste em cada uma das quatro réplicas destinadas para a histologia de gônadas de ambos os sexos e duas réplicas com 4 machos destinados para a reprodução e duas réplicas cotendo 2 fêmeas para a reprodução (proporção de dois machos para cada fêmea). Após o vigésimo primeiro dia, duas réplicas das destinadas a histologia foram utilizadas para análise da gônada de ambos os sexos advindo de cada tratamento e controle. Os organismos contidos nas demais réplicas para estudo histológico seguiram por mais 21 dias de teste sem exposição aos contaminantes, todos em contato apenas com água de cultivo para avaliação de recuperação biológica. Os organismos das duas réplicas de cada sexo destinadas a reprodução foram submetidos após 21 dias em água contaminada a teste reprodutivo, em seguida os mesmos organismos seguiram por mais 21 dias sem a presença dos contaminantes, em água de cultivo limpa e submetidos a nova reprodução ao final do quadragésimo segundo dia de experimento para avaliação da recuperação biológica. Os endpoints avaliados para os testes de reprodução foram: o número de ovos postos, número de ovos viáveis, eclosão e sobrevivência de larvas por 7 dias. Para estatística foi realizado Qui-quadrado e Kruskal Wallis utilizando o programa Bioestat. Após 21 dias de exposição aos contaminantes, observou-se toxicidade, em função das análises estatísticas e pela predominância de fases maduras do desenvolvimento gonadal das fêmeas de *D. rerio* expostas tanto ao corante sintético como ao natural. Para machos de *D. rerio* nas análises histológicas foi observado predomínio de fases maduras apenas para as réplicas expostas ao Índigo Blue. Após a recuperação biológica análises estatísticas de desova e análises qualitativas de tecido gonadal demonstraram potencial de recuperação biológica.

Palavras-chave: histologia, zebrafish, índigo blue, *Indigofera tinctoria*, algas.

MOREIRA, S. C. Ecotoxicological aspects of synthetic and natural indigo dye - with test organisms *D. rerio* and *R. subcapitata*. 2019. 99 p. Dissertation (Master degree in Environmental Sciences)– Sorocaba Institute of Science and Technology, UNESP. Univ Estadual Paulista, Sorocaba. 2019.

ABSTRACT

The textile industry is responsible for most commercially used dyes. According to the literature these contaminants represent toxic potential to aquatic fauna. In this context the synthetic dye, Indigo Blue, stands out due to its intense use in dyeing blue jeans. Before, indigo dye was obtained from the *Indigofera tinctoria* plant, but economic viability superimposed the natural production and made the blue color accessible to society with the synthetic dye production. This study aimed to compare the ecotoxicological aspects of Indigo Blue (synthetic) and Indigo Natural dye (obtained from the *Indigofera tinctoria* plant) by exposing organisms of two different trophic levels to 100 mg / L of each dye (representative concentrations of dyes in flakes textiles). The test organisms used were: 1) *Raphidocelis subcapitata* seaweed with duration of the tests equivalent to 72h and 96h, being evaluated the parameter growth by counting the number of cells in relation to the control group (the concentration studied did not inhibit algal growth) and 2) the *Danio rerio* fish, males and females remained exposed for 21 days, for a total of six replicates for each treatment and for each sex. Three replicates were used in each of the four replicates for the histology of gonads of both sexes and two replicates with 4 males destined for breeding and 2 replicates with 2 females for reproduction (ratio of two males to each female). After the twenty-first day, two replicates destined for histology were used for analysis of the gonad of both sexes coming from each treatment and control. The organisms contained in the other replicates for histological study followed for a further 21 days of testing without exposure to the contaminants, all in contact only with culture water for evaluation of biological recovery. The organisms of the two replicates of each sex destined for reproduction were submitted after 21 days in contaminated water to reproductive test, then the same organisms followed for another 21 days without the presence of the contaminants, in clean culture water and submitted to a new reproduction to the end of the forty-second day of the experiment to evaluate the biological recovery. The endpoints evaluated for breeding tests were: number of eggs laid, number of viable eggs, hatching and survival of larvae for 7 days. Statistical analysis was carried out using chi-square and Kruskal Wallis using the Bioestat program. After 21 days of exposure to contaminants, toxicity was observed, due to the statistical analysis and the predominance of mature stages of the gonadal development of *D. rerio* females exposed to both synthetic and natural dyes. For males of *D. rerio* in the histological analyzes it was observed predominance of mature phases only for the replicas exposed to Indigo Blue. After biological recovery, spatial analyzes of spawning and qualitative analyzes of gonadal tissue demonstrated potential for biological recovery.

Palavras-chave: histology, egg laying, indigo blue, *Indigofera tinctoria*, algae.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
---------------------------	-----------

CAPÍTULO 1: CORANTE ÍNDIGO BLUE: UMA REVISÃO SOBRE DEMANDAS SOCIAIS, IMPACTOS ECOTOXICOLÓGICOS NOS AMBIENTES AQUÁTICOS E POSSÍVEIS SOLUÇÕES...	14
---	-----------

RESUMO.....	15
ABSTRACT	15
1- INTRODUÇÃO	16
2 – METODOLOGIA	17
3 - INDÚSTRIA TÊXTIL: USO E CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA.....	17
4 - CLASSIFICAÇÕES E PROPRIEDADES DOS CORANTES TÊXTEIS: ÊNFASE PARA O ÍNDIGO	20
5 – INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTENDO ÍNDIGO	29
6 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO 2: EFEITOS TÓXICOS DOS CORANTES ÍNDIGO SINTÉTICO E NATURAL SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA</i>	43
---	-----------

RESUMO	43
1 - INTRODUÇÃO.....	43
2 – METODOLOGIA	44
2.1 - Cultivo do organismo teste	44
2.2 - Ensaio de toxicidade	46
2.3 - Quantificação.....	47
2.4 - Análise estatística	47
3- RESULTADOS	48
4 - DISCUSSÃO	49
5 - CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52

CAPÍTULO 3: EFEITOS TÓXICOS DOS CORANTES ÍNDIGO SINTÉTICO E ÍNDIGO NATURAL SOBRE A REPRODUÇÃO DE <i>DANIO RERIO</i>.....	55
---	-----------

RESUMO.....	55
1 – INTRODUÇÃO	56
2 - METODOLOGIA	57
2.1 Manutenção do organismo teste.....	57
2.2. Teste de degradação dos corantes	58
2.3 Bioensaios ecotoxicológicos agudos de caráter preliminar.....	58
2.4 Teste crônico.....	58
2.4.1 – ANÁLISE QUALITATIVA DA HISTOLOGIA DE GÔNADAS DE D. RERIO	59

2.4.2 - ANÁLISE DOS EFEITOS REPRODUTIVOS IMEDIATOS: NÚMERO DE OVOS DA POSTURA, OVOS VIÁVEIS, TAXA DE ECLOSÃO E SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS	60
2.5 - Testes ecotoxicológicos com embriões e larvas de <i>Danio rerio</i> obtidos em situação controle e posteriormente expostos aos contaminantes	62
2.6 - Análise estatística.....	63
3 - RESULTADOS.....	63
3.1 - Reprodução, postura de ovos, eclosão e sobrevivência de larvas	63
3.2 - Histologia de gônadas.....	67
4 - DISCUSSÃO	79
5 - CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE - MEMORIAL FOTOGRÁFICO.....	89

APRESENTAÇÃO

O tingimento é fator crucial na produção têxtil para obter seu sucesso industrial. Desde as civilizações mais antigas, a humanidade utiliza fontes naturais para obter substâncias coloridas e utilizá-las em tecidos e objetos. O primeiro corante sintético surgiu em 1856 e desde então os corantes naturais foram sendo substituídos por compostos sintéticos. A molécula do corante é composta por um grupo cromóforo e por uma estrutura responsável pela fixação à fibra. Os corantes têxteis tem grande persistência no ambiente e os métodos de eliminação tradicionais não são suficientes porque as reações químicas envolvidas podem gerar produtos secundários altamente tóxicos. Um dos corantes amplamente utilizado é o índigo, Adolf von Bayer descobriu como produzi-lo sinteticamente em 1870, anteriormente o corante era obtido da planta *Indigofera tinctoria*. O corante sintético Índigo Blue é utilizado industrialmente em especial devido ao tingimento do “blue jeans”.

Diante da problemática que os corantes representam, em especial pela alta descarga vinda da indústria têxtil, a fauna aquática é a primeira a receber o impacto potencial destes contaminantes. O objetivo geral deste trabalho é compreender os aspectos ecotoxicológicos do corante sintético Índigo Blue e compará-los com o corante Índigo Natural (obtido da planta *Indigofera tinctoria*) utilizando-se para essas análises, dois organismos-teste (o peixe *D. rerio* e a alga *R. subcapitata*).

Para a presente defesa de dissertação, o conteúdo encontra-se estruturado nos seguintes capítulos:

➤ **Capítulo 1: Índigo Blue: uma revisão sobre demandas sociais, impactos ecotoxicológicos nos ambientes aquáticos e possíveis soluções**

Este capítulo trata-se de uma revisão bibliográfica que aborda as principais classificações de corantes de acordo com o método de aplicação, em especial o corante índigo, destacando suas principais características e concentração encontrada em efluentes. Buscou-se informações ecotoxicológicas sobre o corante têxtil Índigo Blue e também sobre o Índigo Natural. Por fim, foi feito um levantamento sobre os tratamentos

para descolorização do índigo. O capítulo 1 foi submetido a revista *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science* e encontra-se formatado segundo as normas da revista. Status: em análise com os avaliadores.

➤ **Capítulo 2: Aspectos ecotoxicológicos no crescimento de *Raphidocelis subcapitata* expostas aos corantes índigo sintético e natural**

Neste capítulo o organismo *R. subcapitata*, produtor primário teve seu parâmetro de crescimento algal analisado frente a exposição aos corantes Índigo Blue e Índigo Natural, separadamente, ambos na concentração de 100 mg/L.

➤ **Capítulo 3: Aspectos ecotoxicológicos na reprodução de *Danio rerio* expostos aos corantes índigo blue e índigo natural**

A reprodução é essencial para a manutenção da espécie, incorporando um importante parâmetro de avaliação ecotoxicológica. Neste capítulo foram avaliados aspectos reprodutivos do organismo *D. rerio* quando exposto ao Índigo Blue e ao Índigo Natural, na mesma concentração estudada para o capítulo anterior. As análises foram realizadas em termos de desova, viabilidade de ovos, sobrevivência larval e histologia de gônadas de machos e fêmeas adultos.

No Apêndice encontra-se o memorial fotográfico de etapas deste trabalho.

CAPÍTULO 1:

CORANTE ÍNDIGO BLUE: UMA REVISÃO SOBRE DEMANDAS SOCIAIS, IMPACTOS ECOTOXICOLÓGICOS NOS AMBIENTES AQUÁTICOS E POSSÍVEIS SOLUÇÕES¹

INDIGO BLUE DYE: A REVIEW ON SOCIAL DEMANDS, ECOTOXICOLOGICAL IMPACTS IN AQUATIC ENVIRONMENTS AND POSSIBLE SOLUTIONS

Sofia Coelho Moreira, Renata Fracácio

Labotaratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia. Instituto de Ciência e Tecnolgia de Sorocaba (ICTS), UNESP – Universiidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Av. Três de Março, 511 – Alto da Boa Vista, CEP: 18087-180, Sorocaba, SP, Brasil. Email:rfracacio@sorocaba.unesp.br

¹ O Capítulo 1 foi submetido a revista *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, encontra-se formatado segundo as normas da revista.

RESUMO

O corante sintético Índigo Blue é amplamente utilizado na indústria têxtil, em especial para conferir a cor característica do “blue jeans”. Representa uma perda de 5% a 20% para o efluente após o processo de tingimento. Objetivou-se entender a presença deste corante no ambiente e seu potencial ecotoxicológico bem como avaliar os principais tratamentos em termos de toxicidade, realizando-se uma ampla revisão bibliográfica. Encontrou-se na literatura que sua concentração usual em efluentes é de 100 mg/L, a qual representa toxicidade pela redução de crescimento algal para a espécie *Desmodesumus subspicatus*. Estudos de tratamentos para este corante em sua maioria não foram acompanhados de análise ecotoxicológica. São necessários trabalhos com análise de risco do corante Índigo Blue antes e após os tratamentos, utilizando-se da ecotoxicologia como ferramenta para criação de diretrizes para a proteção da vida aquática, garantindo a melhor via de recuperação de recursos hídricos frente à sua crescente demanda industrial.

Palavras-chave: corante têxtil, efluentes têxteis, tratamento, recursos hídricos.

ABSTRACT

Indigo Blue synthetic dye is widely used in the textile industry, in particular to confer the characteristic color of "blue jeans". It represents a loss loss of 5% to 20% for the effluent after the dyeing process. The objective of this study was to understand the presence of this dye in the environment and its ecotoxicological potential as well as to evaluate the main treatments in terms of toxicity. It is found in the literature that its usual effluent concentration is 100 mg / L, which represents toxicity by reduction of algal growth for the species *Desmodesumus subspicatus*. Treatment studies for this dye were mostly not accompanied by ecotoxicological analysis. It is necessary to work with risk analysis of Indigo Blue dye before and after treatments using ecotoxicology as a tool to create guidelines for the protection of aquatic life, guaranteeing the best way of recovering water resources in response to its increasing industrial demand.

Key words: textile dye, textile effluents, treatment, water resources.

1- INTRODUÇÃO

As diversas atividades antrópicas geram resíduos que comprometem os múltiplos usos das águas. Como consequência, instala-se a crise hídrica que representa uma ameaça à humanidade e à biosfera (Tundisi & Matsumura 2011). Neste contexto, estima-se que a demanda global de água deverá chegar a 1.500 bilhões de m³ em 2030, em função do crescimento econômico (Vajnhandl & Valh 2014), acarretando a entrada de diferentes poluentes nos ambientes aquáticos, que deverão ser tratados mantendo-se um ambiente seguro em função dos usos pretendidos.

Dentre os setores produtivos, destaca-se na literatura o setor têxtil que lança quantidades significativas de poluentes tóxicos no meio ambiente aquático, comprometendo a saúde ambiental e humana (Kunz et al. 2002). As águas residuais da indústria têxtil são caracterizadas por forte coloração, alta salinidade, pH variável, alta demanda química de oxigênio (DQO) e alta temperatura (Mantzavinos & Psillakis 2004; Beltrame 2000). Cerca de 15% da produção total de corantes se perde nos processos industriais indo para os efluentes têxteis (Zollinger 1991).

Segundo Carneiro e Zanoni (2016), desde os primórdios da civilização a humanidade utiliza fontes naturais para obter substâncias coloridas e utilizá-las em tecidos e objetos. O primeiro corante sintético surgiu em 1856, desde então os corantes naturais foram sendo substituídos por compostos sintéticos (Karkmaz et al. 2004).

O corante índigo obtido até o século XIX era exclusivamente a partir da planta *Indigofera tinctoria* (nativa da Índia) e de cunho artesanal. Era um corante caro e acessível apenas as camadas mais altas da sociedade. Em 1870, o químico alemão Adolf von Bayer descobriu como produzir a molécula do índigo sinteticamente e no início do século XX, a empresa BASF possibilitou a sua ampla produção e comercialização do corante a preços mais baixos, quando comparado ao custo do corante artesanal (Zanoni & Yamanaka 2016; Lima & Ferreira 2001).

Dentre os corantes têxteis sintéticos, o Índigo Blue tem sua aplicação mais expressiva na indústria do “jeans” (Guaratini & Zanon 2000; Zanoni & Yamanaka 2016), uma das roupas mais consumidas no mundo, com um número estimado de dois bilhões de calças jeans vendidas a cada ano. Cerca de 20.000 toneladas/ano de índigo sintético são produzidas mundialmente e utilizados em especial para a tintura do “blue jeans” (Santos 2006). Nesse processo destaca-se ainda o elevado consumo de água que para o tingimento e a lavagem de cada uma delas necessita mais de 100 litros (Hendaoui et al. 2018).

Diante do elevado consumo deste corante na indústria do jeans, em associação com elevada demanda do referido produto no mercado consumidor, bem como a perda dessas moléculas potencialmente tóxicas nos efluentes, que adentram os corpos de água, pretende-se com essa pesquisa, baseada na literatura científica, responder às seguintes questões: a) O corante têxtil sintético Índigo Blue é uma problemática de ecotoxicidade considerando-se a exposição dos organismos aquáticos? b) Existem informações na literatura científica relacionando as concentrações do corante índigo em ambientes naturais com a ecotoxicidade no Brasil e no Mundo? c) Os tratamentos mais utilizados para descoloração de efluentes com presença de índigo asseguram ausência de ecotoxicidade?

2 – METODOLOGIA

Realizou-se uma ampla revisão literária para contemplar dados ecotoxicológicos sobre o corante sintético Índigo Blue bem como a eficiência dos tratamentos clássicos e alternativos para redução da ecotoxicidade. Para esse fim, foram consultadas as plataformas: Science direct, portal da CAPES e Google acadêmico. As palavras-chaves utilizadas foram: “indigo dye”, “ecotoxicity indigo blue”, “*Indigofera tinctoria*”, “*indigo blue decolorization*”, “*indigo blue treatment*”.

3 - INDÚSTRIA TÊXTIL: USO E CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA

Desde a revolução industrial, a indústria têxtil sempre desempenhou um papel significativo e se deslocou continuamente para países produtores de baixo custo, onde também o controle e a legislação não garantem a proteção dos recursos naturais (Nimkar 2018). Representando uma das maiores indústrias mundiais, movimentando mais de um trilhão de dólares e empregando cerca de um bilhão de pessoas (Petreca et al. 2008), a indústria têxtil ocupa a segunda posição considerando-se as questões de poluição ambiental, perdendo apenas para a indústria petrolífera (BBC 2017). Estima-se que seja a atividade industrial que utilize mais água, gerando efluentes altamente poluentes (Bae & Freeman, 2007; Kant 2012).

Mais de 8.000 produtos químicos diferentes são usados em têxteis. Avaliar o impacto desses produtos químicos na saúde humana e no meio ambiente é uma pesquisa que envolve diferentes áreas do conhecimento como química, toxicologia clássica e ambiental, bioquímica, fisiologia, ecologia dentre outras. A população global está crescendo exponencialmente, de apenas 1 bilhão no ano de 1800 para mais de 7 bilhões atualmente, e a previsão é de 11 bilhões na virada do século.

Com um consumo per capita de têxteis e vestuário de 7 kg por pessoa por ano, estamos analisando um consumo de mais de 49 bilhões de quilos de produtos têxteis por ano e consequentemente uma descarga proporcional de químicos (Nimkar 2018).

Para se processar uma tonelada de tecido utiliza-se cerca de 230 a 270 toneladas de água, gerando um efluente proporcional a essa quantidade (Mirjalili et al. 2011). A produção mundial de tecidos atingiu 83 milhões de toneladas em 2014 (EPA 2014).

A água é um dos elementos básicos para as etapas de tingimento e alvejamento, as mais contaminantes (Berlim 2015). O tingimento é fator crucial na produção têxtil por garantir seu sucesso comercial. Fazem parte das exigências do consumidor padronagem e beleza da cor, bem como resistência do produto à luz, lavagem e transpiração (Guaratini et al. 1999).

O processo de tingimento compreende três etapas: montagem (transferência da solução para a superfície da fibra), fixação (que pode ocorrer pela reação entre o corante e o tecido, pela montagem do corante insolúvel na forma solubilizada ou pela alteração da fibra) e o tratamento final (que consiste numa lavagem a quente com detergentes para retirar o excesso de corante impedindo que a parcela não fixada não se solte na primeira lavagem ou até mesmo pelo suor do consumidor) (Beltrame 2000).

A água residual da indústria têxtil com corantes e produtos intermediários apresentam intensa coloração do ponto de vista ambiental, a remoção da cor do efluente proveniente do processo de tingimento é um dos grandes problemas do setor têxtil (Hao & Kim 2000; Albuquerque 2009). O lançamento não controlado destes efluentes dificulta a penetração de luz e consequentemente interfere na produtividade primária, base da cadeia alimentar, tendo consequências indesejáveis em toda a estrutura trófica (Vautier et al. 2001; Albuquerque 2009).

Os corantes não são degradados no meio ambiente com facilidade, podendo permanecer por um longo período no ecossistema (Saggiaro 2014). Como em sua constituição molecular há a presença de nitrogênio e carbono, persistindo em ambientes aquáticos, os corantes podem causar eutrofização, processo caracterizado pela ocorrência de crescimento excessivo de algas e plantas aquáticas devido ao excesso de nutrientes na água (Zollinger 1991). A eutrofização das águas tem provocado a deterioração dos ecossistemas aquáticos e produzido impactos ecológicos, econômicos, sociais e de saúde pública (Tundisi & Matsumura 2011).

Até mesmo em pequenas quantidade (1mg/L) alguns corantes podem interferir na dinâmica aquática (Albuquerque 2009). França, Estados Unidos e Alemanha são alguns dos países que possuem limites de valores para a coloração de efluentes porém cada país utiliza diferentes unidades e torna a comparação inviável. Na França, uma amostra de efluente colorido é diluída por um fator de 30, se após a diluição não houver coloração visível, o efluente está cumprindo com a norma enquanto que na Alemanha utilizam uma metodologia denominada DFZ

(DurchsichtsFarbZahl) que exprime valores máximos de absorvância para três comprimentos de onda distintos do espectro de luz (Hessel et al. 2007).

No caso do Brasil, ainda não há uma legislação específica que delimite padrões de cor para efluentes. Entretanto, no CONAMA 357 (2005), Artigos 15-III e 16-I, entende-se que, na ausência de padrões definidos, devem-se adotar os padrões disponíveis para a classe em que os corpos receptores estiverem enquadrados. Desta forma, para corpos hídricos de água doce classificados como Classes 2 e 3, o valor tolerável de cor real ou verdadeira utilizando-se da escala platina-cobalto para avaliação de cor seria de até 75 mg Pt/L (CONAMA 2005).

No que se refere à cor e qualidade de águas doces foram encontradas informações na CONAMA 357 (2005).

O Artigo 16º, define que:

“Não será permitida a presença de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais”

Segundo CONAMA 430 (2011) que complementa a resolução CONAMA 357 (2005), em seu artigo 18 relata que o efluente não deve provocar ou ter potencial para desencadear efeitos tóxicos aos organismos aquáticos do corpo que o recebe, e deve-se realizar ensaios ecotoxicológicos com métodos padronizados, aceitos pelo órgão ambiental, utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes.

O Art. 3º salienta que:

“Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis”.

Segundo Tundisi e Matsumura (2011), as diferentes atividades humanas representam diferentes impactos econômicos sobre os recursos hídricos superficiais e subterrâneos. A recuperação da água deve considerar os componentes econômicos que envolvem a infraestrutura socioeconômica, os custos de tratamento e o valor agregado que consiste em água de excelente qualidade que proporciona múltiplas atividades. Outro aspecto a ser considerado é que a visão econômica do Estado difere da visão econômica das comunidades locais quanto aos recursos hídricos e suas aplicações.

Para limitar o impacto ambiental do processamento têxtil uma alternativa é investir em estações de tratamento de efluentes altamente eficientes que não gerem resíduos ou subprodutos mais tóxicos que os iniciais (Mirjalili et al. 2011).

4 - CLASSIFICAÇÕES E PROPRIEDADES DOS CORANTES TÊXTEIS: ÊNFASE PARA O ÍNDIGO

Os corantes são utilizados para diversos fins em outras indústrias mas é no setor têxtil que dipõem-se da maior quantidade de corantes em seu processo de tingimento (Bafana et al. 2011). A cor de um tecido desempenha um papel importante na decisão de compra de qualquer item de vestuário, essa cor tem algum custo. E se estes custo interfere na disponibilidade de recursos do planeta, é preciso repensar estratégias nas questões relacionadas ao tingimento de tecidos (Hussain & Wahab 2018).

São denominados corantes os produtos que provocam modificações físico-química no substrato em que está presente, de modo que a luz refletida provoque uma percepção de cor. Estas substâncias são compostos orgânicos capazes de colorir têxteis, de forma que a cor seja relativamente resistente (sólida) à luz e à tratamentos úmidos. Os corantes são solúveis ou dispersos no meio de aplicação (água). No tingimento, os corantes são adsorvidos e se difundem para o interior da fibra (Twardokus 2004).

Há duas formas de classificação dos corantes têxteis: pela sua estrutura química ou pelo modo como o corante se fixa à fibra (Zollinger 1991). A molécula do corante é composta pelo: grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra (Kunz et al. 2002). Segundo a estrutura química, que considera o cromóforo para agrupar corantes têxteis com características semelhantes, é possível classificá-los em: azo (que apresentam ampla variedade de cores e resistência à exposição luminosa), antraquinonas (que apresentam um baixo indicador de custo/benefício), metalizados (melhoram resistência à lavagem e exposição luminosa), indigóide (dentro dessa classe de corantes que apresentam baixíssima solubilidade o mais importante é o índigo, famoso pela cor do *Blue Jeans*), fitalocianinas (que apresentam brilho intenso), metina (nesta classe os principais representantes são os carotenóides), di e triarilmetina (que apresentam absorção intensa na região do visível), nitro e nitrosos (difícilmente são empregados) e os corantes sulforosos (utilizados normalmente em fibra celulósica) (Zanoni & Carneiro 2016).

De acordo com o uso e o método de aplicação, os corantes podem ser classificados segundo a relação com o tipo de fibra que se fixará. Existem fibras naturais (algodão, sisal, lã, linho, couro, seda), fibras artificiais representadas pela viscose e acetato, que resultam do tratamento químico da celulose e fibras sintéticas, como a poliamida e o poliéster, que provêm de matéria prima da indústria petroquímica (Zanoni & Carneiro 2016). Esta segunda forma de

classificação que leva em conta o substrato em que se fixará divide os corantes em: reativos (algodão, lã, seda e poliamida), diretos (algodão, viscose, seda e poliamida), azoicos (algodão, viscose, acetato de celulose poliamida), dispersos (poliéster, acetato de celulose, acrílico e poliamida), ácidos ou aniônicos (poliamida, lã, seda, couro e acrílico modificado), à tina (algodão, viscose e lã), à cuba (algodão e viscose), pré-metalizados (lã e couro), branqueadores ópticos (aplicados a todas as fibras) e catiônicos (lã, seda, algodão, couro e fibras acrílicas) (Zollinger 1991). Informações relevantes sobre a classificação dos corantes, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação de corante têxtil segundo método de aplicação.

Classe	Principais substrato	Método de aplicação	Cromóforos associados	Aspectos relevantes do tingimento
Reativos	Algodão, lã, seda e poliamida	Sítios reativos do corante reagem com os grupos funcionais da fibra através de ligações covalentes sob influência do calor e pH.	Azo, antraquinona, ftalocianina, formazana e oxazina	Alta solubilidade, resistência à lavagem; processos de tingimento simples e cores brilhantes
Diretos	Algodão, viscose, seda e poliamida	Tingimento por adsorção via interações de Van der Waals em banhos neutros ou ligeiramente alcalinos contendo eletrólitos adicionais ou mordentes	Azo, diazo, ftalocianina, oxazina, metalizados e estilbenzeno	Alta solubilidade; alto rendimento do processo de tingimento; melhorado pelo uso de eletrólitos, pela planaridade da molécula ou dupla ligações conjugadas na estrutura do corante.
Azoicos	Algodão, viscose, acetato de celulose e poliéster	Corantes insolúveis em água formados sobre os poros da fibra entre um agente de acoplamento solúvel com afinidade pela fibra e um sal de diazônio também solúvel	Azo	Alto padrão de fixação; alta resistência à luz e umidade
Dispersos	Poliéster, acetato de celulose, acrílico e poliamida	Tingimento sob a forma de fina dispersão aquosa, muitas vezes aplicada com alta temperatura/pressão	Azo, antraquinona, nitrito, estirílico, benzodifuranona	Custo baixo: praticamente insolúvel em água e não iônicos; ampla gama de tonalidades;

		usualmente com auxílio de agentes dispersantes ou por processo de termofixação		resistência à lavagem e luz; apresentam moléculas pequenas
Ácidos aniônicos	ou Poliamida, lã, seda, couro e acrílico modificado	A fixação do corante à fibra acontece em meio neutro ou ácido através dos sítios aniônicos do corante com os sítios catiônicos da fibra via interação iônica, interação de Van der Waals ou pontes de hidrogênio	Azo (inclusive azo metalizado), antraquinona, trifenilmetano, triarilmetano, azina, xanteno, nitrito e nitroso	Podem ser de 3 tipos: apresentam-se como corantes aniônicos portadores de 1 a 3 grupos sulfônicos e por esta razão solúveis em água e que conferem a carga negativa ao corante; observa-se semelhante efeito com grupos carboxílicos, extensa gama de colaração e boa fixação
À tina	Algodão, viscose e lã	Insolúveis em água são reduzidos à forma leuco solúvel com ditionito de sódio em meio alcalino. Após interação com fibra são oxidados a forma insolúvel quando em contato com ar fixando-se à fibra.	Antraquinona, indigoides e tioindigoides	Conhecidos como corantes Vat; boa fixação com cores sólidas porém baixa resistência lavagem.
À cuba	Algodão, viscose	Devido à falta de solubilidade são reduzidos a forma leuco com ditionito de sódio em banho alcalino com outros agentes (eletrólitos e sulfeto de hidrogênio ou de sódio). Após interação com fibra são oxidados a forma insolúvel quando em contato com ar fixando-se à mesma.	Estruturas macromoleculares com pontes de polissulfeto originadas após tionização de intermediários orgânicos contendo grupos nitrito e amino.	Insolúveis em água; fornecem tons preto, verde oliva, azul marinho e marrom; baixo custo; boa fixação e resistência a lavagem, porém a tintura gera resíduos tóxicos
Pré-metalizados	Lã, couro	Possui pouca ou nenhuma afinidade com fibra,	Azo e antraquinona	Cores diferenciadas em função do

		porém se fixa a ela com adição de um mordente, produto químico que se combina com o corante e a fibra. Os principais mordentes modernos são derivados de crômio, como o dicromato.		mordente; formação de complexo metálico; rejeitos tóxicos
Branqueadores ópticos	Aplicado a todas as fibras	Estes corantes são aplicados na forma de dispersão ou suspensão. As fibras têxteis sofrem inicialmente tratamento para descolorimento e acabam assumindo tonalidade amarelada, necessitando de tratamento com corantes brancos ou fluorescentes que neutralizam o tom amarelo.	Estilbenzenos, coumarina, naftalamida, pirazol, moléculas com grupos carboxílicos, azometino ou etilênicos aliados a sistemas benênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos	Estas fibras quando expostas a radiação UV brilham no escuro; estes corantes provocam reações alérgicas e rejeitos tóxicos.
Catiônicos	Lã, seda, algodão, couro e fibras acrílicas. Pouca afinidade com fibras celulósicas	A fixação do corante à fibra acontece através dos sítios catiônicos (positivos) do corante com os sítios aniônicos (negativos) da fibra via interação iônica, interação de van der Waals ou pontes de hidrogênio. O tingimento ocorre empregando usualmente ácido acético que colabora para a fixação do corante à fibra e solubilidade em água.	Polimetina, di e triarilmetina, antraquinona e azo	O termo “corantes básicos” é também usado para esta classe pelo Colour Index, embora segundo Zollinger (1991), este termo não esteja correto; são corantes solúveis em água; apresentam vasta variedades de cores; apresentam brilho; pouca resistência à luz; boa resistência à umidade, bom rendimento; baixo custo

As diferentes formas de classificação dos corantes segundo seu modo de fixação refletem nas diferentes perdas ao longo do processo industrial. Na Tabela 2, consta a porcentagem de corante que acaba sendo eliminada no efluente por não se fixar à fibra durante o processo de tingimento.

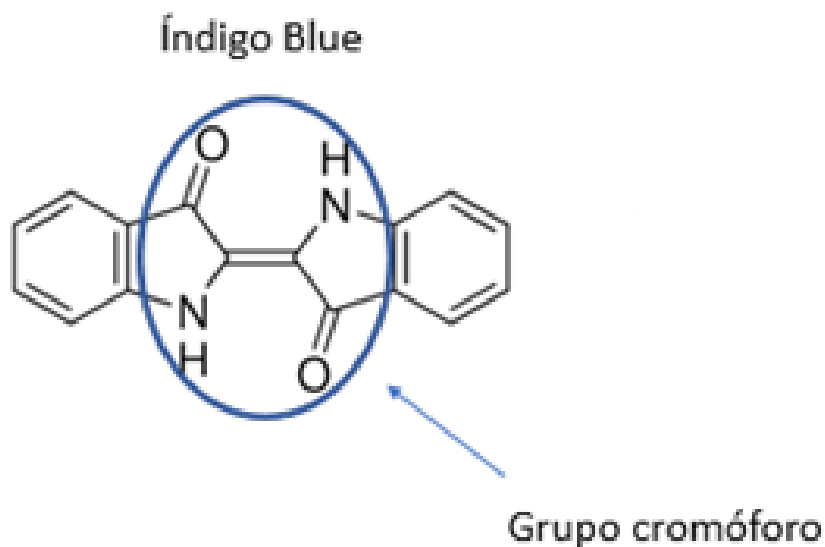
Tabela 2 - Percentual de corantes não fixados à fibra e descarregados no efluente

Classe de corante	Fibra	Perda no efluente (%)
Ácido	Poliamida	7 a 20
Básico	Acrílica	2 a 3
Direto	Algodão	5 a 20
Disperso	Poliéster	1 a 20
Complexo-metálico	Lã	2 a 5
Reativo	Algodão	10 a 50
Sulfuroso	Algodão	10 a 40
Tina	Algodão	5 a 20

Fonte: adaptado de Beltrame (2000).

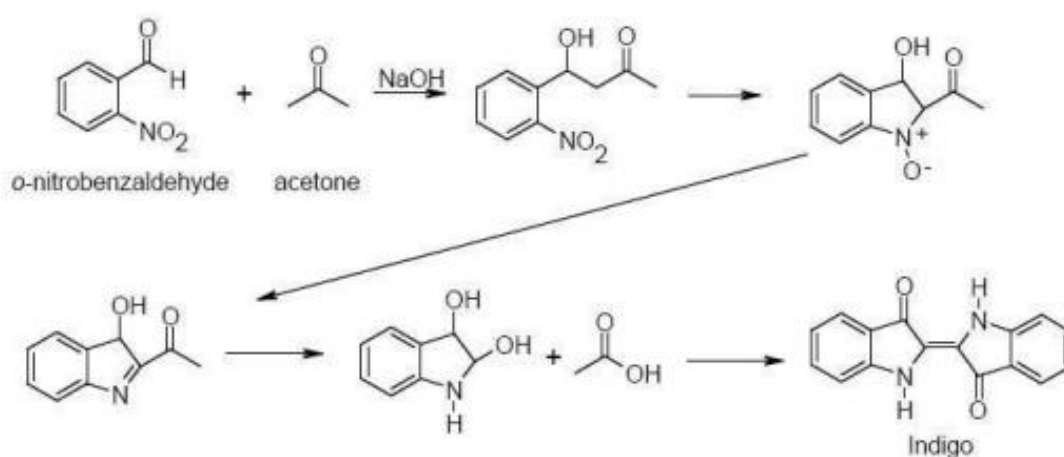
Sendo um dos mais antigos produzidos, o índigo é um dos corantes mais utilizados na indústria têxtil, representa cerca de 3% da produção total de corantes e atualmente sua principal aplicação industrial é no tingimento de roupas, destacando-se o “blue jeans” (Vautier et al. 2001).

O corante comercial sintético Índigo Blue, tem fórmula molecular $C_{16}H_{10}O_2N_2$ e fórmula estrutural conforme Figura 1, reproduzindo o corante índigo natural obtido da *Indigofera tinctoria*. Pertence a classificação indigóide (segundo sua estrutura química) e de corantes à tina (de acordo com sua aplicação e substrato) (Zanoni & Carneiro 2016). A baixa solubilidade do índigo explica-se pela existência de fortes forças intermoleculares entre as ligações de hidrogênio. A estrutura básica produtora de cor dos corantes indigóides é um sistema cruzado conjugado ou H-cromóforo, consistindo de uma única ligação dupla $-C = C-$ substituída por dois grupos doadores de NH e dois grupos aceitadores de CO (Vautier et al. 2001). Em destaque na Figura 1 está o grupo cromóforo que é a estrutura responsável por conferir cor.

Figura 1 - Estrutura química do corante Índigo Blue

Fonte: adaptado de Sigma Aldrich (2014).

O índigo sintético é obtido a partir da reação do o-nitrobenzaldeído e acetona em meio alcalino pela reação exposta na Figura 2 (Mckee & Zanger 1991).

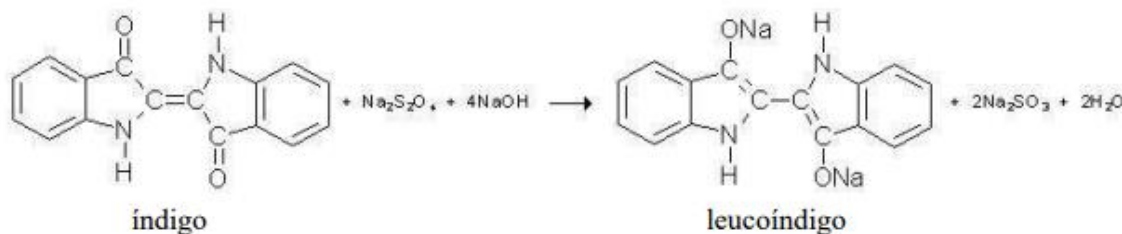
Figura2: Síntese corante índigo sintético

Fonte: Albuquerque (2009)

Para o tingimento, o índigo precisa ser reduzido a sua forma leuco com a ajuda de um solvente (característica dos corantes à tina), industrialmente o diotinito de sódio é muito

utilizado. O corante após fixado à fibra sofre reoxidação e retorna a sua forma original insolúvel conforme Figura 3 (Pascoal & Temilliose-filho 2005).

Figura 3 - Redução química do índigo com o ditionito de sódio



Fonte: Albuquerque (2009)

Em organismos aquáticos o processo de bioacumulação pode ocorrer pela exposição a sedimentos, água ou biomagnificação por ingestão de alimento (Azevedo & Chazin 2003). A baixa solubilidade torna o corante mais propenso a apresentar ecotoxicidade em meio aquático, pois os corantes menos solúveis têm mais chance de serem absorvidos por organismos e entrarem para a cadeia alimentar sendo ingeridos diretamente (Klaassen et al. 2013 apud; Zanoni & Yamanaka 2016). Não sendo metabolizadas, serão armazenadas em depósitos de gordura ou em outros locais lipofílicos, como membranas de lipoproteínas. Esse armazenamento de xenobióticos lipofílicos potencialmente tóxicos pode ser protetor a curto prazo. A longo prazo, entretanto, a liberação do armazenamento pode ocorrer e causar efeitos tóxicos (Pekall et al. 2012).

Em contrapartida sobre a questão de solubilidade também encontra-se na literatura a informação de que quanto mais solúvel, maior biodisponibilidade o contaminante apresentará e portanto maior potencial de toxicidade à comunidade aquática (Spacie et al. 1995 apud; Zagatto & Bertoletti 2006). Para causarem efeitos adversos, os corantes necessitam ser absorvidos, uma possível abordagem para esta dualidade de informação é levar em conta a forma de exposição. O poluente insolúvel apresenta maior exposição por via de ingestão entrando diretamente na cadeia alimentar, enquanto que o solúvel está em maior contato com a membrana dos organismos aquáticos, no caso de peixes, por exemplo, ao passar pelas brânquias o contaminante chega a corrente sanguínea.

Nas Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos encontradas para o corantes índigo: Arinos (2005), Chemtrec (2008), Chemwatch (2012), observou-se uma ausência de dados para ecotoxicologia aquática deste corante sintético. Para o corante índigo sintético usado comercialmente, Índigo Blue, foi encontrada na ficha de informações de

segurança da Sigma Aldrich (2014), informação de que para algas da espécie *Desmodesmus subspicatus* o valor da concentração de efeito CE50 (72h) de 100 mg/L. Segundo Albuquerque (2009), 100 mg/L é a concentração de corante índigo usualmente encontrado em efluentes têxteis que utilizam o corante índigo.

Diante das escassas informações ecotoxicológicas sobre o corante índigo sintético e sobre o obtido naturalmente, foi elaborada a Tabela 3 com dados referentes a ecotoxicidade de outros corantes classificados como corantes à tina. Observa-se que a relação de concentração de efeito varia muito de um corante para outro, tornando-se importante o estudo específico de cada um.

Tabela 3 - Ecotoxicidade de outros corantes de uso têxtil da classificação à tina.

<i>Corante</i>	<i>Classe química</i>	<i>Organismo</i>	<i>Efeito Observado</i>	<i>Resultado (mg. L⁻¹)</i>	<i>Referência</i>
<i>Disperse Blue 3</i> (2475-46-9)	Antraquinona	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inibição do crescimento	CE50(96h)= 0,5	Novotný et al. (2006)
<i>Remazol Brillhante Blue (n.d.)</i>	Antraquinona	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inibição do crescimento	CE50(96h)= 81,1	Novotný et al. (2006)
<i>Vat Green 3</i> (3271-76-9)	Vat	<i>Daphnia similis</i>	Imobilidade	CE50(48h) = 6,9	Luna et al. (2014)
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inibição da reprodução	CI50(7d)= 0,5	
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inibição do crescimento	CI50(72h) = 5,6	

Fonte: Adaptado de Zanoni & Yamanaka 2016

Testes de toxicidade de corantes no geral com organismos de água doce são relativamente recentes, dados da literatura mais antigos denotam do estudo de Novotny et al. (2006) que estudou corantes antraquinonas e corantes azo também utilizando diferentes organismos-teste: bactéria, protozoário e algas. Os resultados demonstraram que o uso comparativo de vários testes, que empregam vários organismos de diferentes complexidades

biológicas é uma abordagem eficiente para avaliação da toxicidade geral de poluentes em estudos de avaliação de risco. Dos métodos aplicados, o teste de algas que avalia a inibição do crescimento, foi o mais sensível para avaliar a toxicidade dos corantes testados. As algas são produtoras primárias na cadeia alimentar aquática e qualquer alteração em sua comunidade pode afetar a estrutura e a função de todo o ecossistema aquático (Masutti 2004) portanto nos estudos com corantes nos últimos doze anos o organismo teste escolhido preferencialmente para estudos com diferentes corantes são as algas, destacando-se: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Selenastrum capricornatum* e *Raphidocelis subcapitata* (sendo o último a última nomenclatura a que atualmente que designa a mesma espécie dos nomes anteriores). Enquanto Novotný et al. (2006) observou a inibição do crescimento algal dos organismos expostos ao corante da classe antraquinona, Ramazol Brilhante Blue, a uma concentração de 81,1 mg/L; o mesmo teste realizado com o corante de classificação azo denominado Reactive Orange apresenta efeito inibitório a uma concentração dez vezes menor.

Outro organismo teste que aparece comumente em estudos com corante, são os microcrustáceos. Quando aglomerados, os corantes menos solúveis podem ocasionar danos físicos afetando a capacidade de movimentação, habilidade essencial para captura de alimentos na vida de microcrustáceos. Esses danos devem ser avaliados em paralelo aos possíveis impactos causados por agentes químicos (Zanoni & Yamanaka 2016).

Estudos com peixes só foram encontrados em uma referência, Liu et al. (2007) que expôs adultos e embriões de *Danio rerio* ao corante da indústria de tinturas de cabelo (HC Orange 1), obtendo valores distintos de efeito quando utilizando o mesmo organismo em fases de vida diferente. Por exemplo, na fase embrionária apresentando ovos coagulado na concentração de 0,57 mg/L enquanto que o parâmetro de mortalidade para adulto num teste agudo de exposição por 96hs apresentou concentração de letalidade igual a 4,04 mg/L. A espécie *D. rerio* é um modelo atrativo tanto para o estudo de toxicidade para humanos como para o meio ambiente, de desenvolvimento e manipulação fácil em laboratório e transparência embrionária (Scholz et al. 2008).

Diante da diversidade de concentrações que os corantes representam em termos de risco a biota, faz-se necessária avaliação de risco ecotoxicológico específico para cada corante dentre os mais utilizados na indústria têxtil. Não podendo-se agrupar corantes pertencentes a mesma classificação a um mesmo risco, tendo como exemplo as diferentes concentrações de efeito de corantes a tina da Tabela 3, que diferem nas respostas do teste com a alga da mesma espécie. Salienta-se também a importância de considerar a espécie do organismo-teste na fase de vida com maior sensibilidade para garantir a proteção de uma ampla gama de organismos no

ambiente natural. A avaliação de risco gera dados que direcionem a tomada de decisões tanto por órgãos regulamentadores competentes de proteção ambiental como por gestores industriais a garantirem processos produtivos mais sustentáveis.

Para maior avaliação ecotoxicológica do corante Índigo Blue faz-se necessário testes com diferentes organismos e em diferentes estágios de vida, visando assim a proteção das espécies aquáticas mais sensíveis.

5 – INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTENDO ÍNDIGO

A disponibilidade adequada de água limpa para beber, saneamento e uso industrial é um dos maiores desafios do século XXI. O rápido aumento da população global e a industrialização sobrecarregaram nossos recursos naturais e colocaram enormes desafios ao nosso ecossistema (Dobilaite et al. 2017).

Por conter uma diversidade grande de substâncias, é difícil estabelecer qual o tratamento mais adequado para os efluentes da indústria têxtil, pois é necessário estudar a viabilidade para cada caso. Os tratamentos mais utilizados no Brasil são os primários e secundários, que englobam tratamentos físico, químico e biológico por lodo ativado. Por representarem maiores custos, os tratamentos terciários e avançados não são muito utilizados (Peres & Abrahão 1998). A Tabela 4 caracteriza os tipos processos de tratamento.

Tabela 4 - Processos de tratamento de efluentes

Tratamento	Tipo de processo	Operação Unitária
Primário	Físico	Equalização
		Gradeamento
		Clarificação/sedimentação
		Flotação
	Químico	Neutralização
		Coagulação/Sedimentação
Secundário	Biológico	Lodos ativados
		Filtros Biológicos
		Lagoas de estabilização
	Físico/Químico	Carvão ativado
Terciário	Químico	Coagulação/Precipitação
		Ozonização
		Cloração
	Físico	Clarificação (carvão ativado)
		Ultrafiltração
Avançado	Físico	Osmose reversa
		Evaporação

Fonte: adaptado de Peres e Abrahão (1998).

As principais técnicas disponíveis na literatura para descoloração das águas de rejeito envolvem principalmente processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica, fotoquímica e biodegradação (Guaratini & Zanoni 1999).

Os corantes têxteis têm grande persistência no ambiente, e os métodos de eliminação tradicionais não são suficientes porque as reações químicas envolvidas podem gerar produtos secundários altamente tóxicos (Mansilla et al. 2012). Foi observado por Luna et al. (2014) após tratamento do corante Vat Green 3, citado na Tabela 3 que reúne informações de corantes de mesma classificação do corante índigo, quando os processos oxidativos avançados apresentaram subprodutos mais tóxicos.

Tabela 5 - Principais métodos não biológicos para tratamento de efluentes

Métodos não biológicos	Vantagem	Desvantagem
Reagente Fenton	Efetiva descoloração de corantes solúveis e insolúveis	Geração de lodo
Ozonização	Aplicado no estado gasoso sem alterar o volume do efluente	Baixo tempo de vida (20 minutos)
Foquímico (Reação de oxidação com NaOCl)	Não produção de lodo e aceleração de quebra da ligação azo	Formação de aminas aromáticas
Destruição eletroquímica (Reação de oxidação usando eletricidade)	Compostos formados não são perigosos	Alto custo de eletricidade
Carvão ativado	Boa remoção de todos os tipos de corantes	Muito caro
Filtração por membrana	Remoção de todos os tipos de corantes	Concentrada produção de iodo
Resina de troca iônica	Não há perda de resina	Não efetivo para todos os corantes
Coagulação eletrocinética	Viável economicamente	Alta produção de lodo

Fonte: adaptado de Saggioro (2014)

Dentre as opções de tratamento de efluente têxtil, o processo biológico, representado pelo sistema de lodos ativados é um dos mais utilizados. Neste processo, ocorre a agitação dos efluentes na presença de microorganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. A desvantagem é que ocorre a geração de grande volume de lodo e a efetividade do processo fica a mercê da composição do efluente (Kunz et al. 2002).

Dentre os processos alternativos de tratamento que vêm sendo utilizados para o tratamento de águas residuais de processos de tingimento há a biorremediação, utilizando-se, normalmente, os microorganismos representados por fungos e bactérias para remoção da cor

(Tastan et al. 2010). Segundo Quintero e Cardona (2009), o tratamento por biorremediação apresenta elevada capacidade de remoção de corantes têxteis e são necessários mais estudos para avaliar fatores econômicos e otimização do processo em grande escala.

Para o corante índigo sintético, uma revisão bibliográfica dos tratamentos estudados recentemente e suas taxas de remoção encontram-se na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Métodos de tratamentos e quantidade (%) descolorida retirada de corante índigo

Método de tratamento	% de remoção	fonte
Fotodegradação catalítica com TiO ₂	100	Vautier et al. (2011)
Eletrocoagulação	83,77	Hendaoui et al. (2018)
Degradação com a levedura <i>Diutina rugosa</i>	99,97	Bankoli et al. (2017)
Adsorção com biomaterial integrado de sódio carboximetilcelulose e quitosana	50	Zhu et al. (2016)
Biodegradação por Cyanobactéria	91	Dellamatrice et al. (2017)
Tratamento eletroquímico com adição de NaCl	90	Camesselle et. al(2005)
Filtração por membrana	98	Buscio (2014)
Reatores com culturas de bactérias	85/90	Manu (2002)
Biorremediação com fungo		Balan & Monteiro (2001)

<i>Phellinus gilvus</i> ;	100;	
<i>Pleurotus sajor-caju</i> ;	94;	
<i>Pycnoporus sanquinus</i> ;	91;	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	75	
Coagulação com águas residuais de salinas	91	Albuquerque (2009)

Fonte: Autoria própria.

Apesar dos tratamentos de fotodegradação catalítica com TiO_2 , degradação com a levedura *Diutina rugosa*, adsorção com biomaterial integrado de sódio carboximetilcelulose e quitosana, tratamento eletroquímico com adição de NaCl, coagulação com águas residuais de salinas filtração por membrana e biorremediação com fungos da Tabela 6 apresentarem eficiência maior que 90% em relação a remoção da cor, não há recorrência de análise ecotoxicológica para avaliar se os subprodutos gerado nos tratamentos de índigo asseguram o que a legislação brasileira segundo Artigo 18 da CONAMA 430 (2011) exige para garantir a proteção da vida aquática. Apenas no estudo de biodegração que utiliza-se da cianobactéria *Phormidium autumnale* foram conduzidos testes que constataram além da remoção química (redução de 91% da coloração) a ausência da toxicidade.

Os compostos tóxicos surgem como intermediários quando ocorre a degradação dos corantes. Isso ocorre devido a quebra do grupo cromóforo do corante que leva a formação de um composto normalmente mais tóxico que o original (Rodrigues 2013). Portanto além da remoção química é essencial a avaliação ecotoxicológica dos tratamentos sugeridos. Dentre os tratamentos apresentados nos trabalhos da Tabela 6 apenas Dellamatrice et al. (2017) conduziu testes para avaliações toxicológicas utilizando os organismos *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornatum* e sementes de alface demonstrando que o tratamento com a cianobactéria *Phormidium autumnale* é capaz de remover a coloração e não provocar toxicidade.

Balan & Monteiro (2001) utilizaram uma variedade de fungos para avaliar a remoção da cor sem vincular o estudo a uma análise ecotoxicológica para avaliar a ação enzimática que

cada fungo produziu. Dessa maneira não é possível afirmar que o tratamento com maior percentual é o de maior sucesso em termos de proteção da vida aquática, ao considerar apenas a redução da coloração. Efluentes podem manter-se tóxicos mesmo cumprindo condições químicas pré-estabelecidas por legislações que estabeleçam parâmetros de descarte relacionados a cor. Bioensaios tem a vantagem de apresentarem o impacto total do poluente expondo organismos vivos ao efeito total de fatores (Sponza 2006).

Zanoni e Yamanaka (2016) destacaram que muitas vezes a descoloração em si ocorre por conta de degradações parciais que podem ser até mais danosas que o corante original. Métodos de detecção de cor em efluentes devem ser apenas uma pré caracterização para que na sequência sejam avaliados efeitos biológicos como indicadores de toxicidade. São efeitos significantes: alterações no crescimento e reprodução, letalidade, modificações comportamentais e fisiológicas e histológicas, alterações bioquímicas, genéticas ou teratogênicas.

A condição ideal de tratamento é aquela na qual há completa oxidação dos compostos orgânicos, o que significa sua conversão em água, dióxido de carbono e íons, mas é essencial avaliar se a degradação derivou produtos mais tóxicos que o inicial (Legrini et al. 1993). Nessa vertente a ecotoxicologia auxilia na classificação da qualidade da água, mensuração do grau de periculosidade dos contaminantes para o organismo e para o ambiente, indicar padrões para regulamentação, diagnosticar e prognosticar os efeitos dos contaminantes no ambiente (Costa et al. 2008).

6 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão apresentada, observa-se que o corante Índigo Blue apresenta-se no ambiente aquático como potencial risco ecotoxicológico. A partir da concentração 100 mg/L, concentração também citada pela literatura como a comum em efluentes que contém índigo, é evidente para os organismos *Desmodesmus subspicatus* a toxicidade devido a redução no crescimento algal. Por sua característica de persistência no ambiente apresenta-se como potencial problemática para organismos de outros níveis tróficos, sendo necessários testes ecotoxicológicos complementares.

Não há na literatura uma base de dados sólida associando análise química e ecotoxicológicas pós tratamento do corante para gerar uma concentração segura de exposição dos organismos e elencar os tratamentos mais adequados em termos de segurança ambiental. Destaca-se também que a questão da presença de cor em efluentes é avaliada por diferentes metodologias em cada país inviabilizando uma normatização de descarte baseada apenas na remoção da cor. Nesse sentido trabalhos com análise de risco do corante Índigo Blue antes e após tratamentos utilizando-se da ecotoxicologia como ferramenta para assegurar a proteção da vida aquática devem ser encorajados, garantindo a melhor via de recuperação dos recursos hídricos utilizados nos processos industriais.

REFERÊNCIAS

Albuquerque LF 2009. *Aplicação de água residuária das salinas no tratamento de efluente têxtil*, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 170 pp.

Arinos. *Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico Índigo*. 2005. Disponível em:< <https://fscimage.fishersci.com/msds/60300.htm>>. Acesso em: 04 de Jan. 2018.

Azevedo FA, Chasin AM 2003. *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*, Intertox, São Carlos, 340 pp.

Bae J. S., Freeman H. S 2007. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes Pigm* 73:81-85.

Bafana A., Devi SS, Charrabarti T 2011. Azo dyes: past, present and the future. *Environ Rev* 19:350-371.

Balan DSL, Monteiro RTR 2001. Decolorization of textile indigo dye by lignninolytic fungi. *J Biotechnol*, 89: 141-145.

Bankolea BE, Adekunle AA, Obidic OF, Olukannid OD, Govindware SP 2017. Degradation of indigo dye by a newly isolated yeast, *Diutina rugosa* from dye wastewater polluted soil. *J Env Chem Eng* 5:4639-4648.

BBC 2017. *Qual é a indústria que mais polui o meio ambiente depois do setor do petróleo?* [acessado 24 de Março de 2018]. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/se/geral-39253994>. Acesso em: 24 mar. 2018.

Beltrame LTC 2000. *Caracterização de efluente têxtil e proposta de tratamento*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 179pp.

Berlim, L 2015. *Moda e Sustentabilidade: Uma reflexão necessária*, Estação das Letras, São Paulo, 159 pp.

Buscio V, Crespi M, Gutiérrez-bouzán C 2015. Sustainable dyeing of denim using indigo dye recovered with polyvinylidene difluoride ultrafiltration. *Clea Prod* 91:201-207.

Cameselle C, Passos M, Sanróman M 2005. Selection of an electrolyte to enhance the electrochemical decolourisation of indigo - Optimisation and scale-up. *Chemosphere* 60:1080-1086.

Carneiro PA, Zanoni VBM 2016. Corantes Têxteis. In: Zanoni, VB, Yamanaka H, *Corantes Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*, Editora UNESP, São Paulo, p. 13-38.

Chemtrec 2008. *Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico. Índigo*. [acessado 20 de Janeiro de 2018]. Disponível em: <https://fscimage.fishersci.com/msds/60300.htm>.

Chemwatch 2012. *Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico. Índigo*. [acessado 20 de Janeiro de 2018]. Disponível em: <http://datasheets.scbt.com/sc-206056.pdf>

CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões para a descarga de efluentes, complementa e modifica a Resolução No. 357/2005 [acessado 14 de Maio de 2018]. Available from: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>

CONAMA nº 357 2005. *Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução de 17 de março de 2005* Diretrizes para classificação de corpos d'água e ambiental diretrizes para sua classificação, bem como estabelece as condições e padrões para a descarga de efluentes e fornece outras medidas [acessado 14 de Maio de 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>

CONAMA nº 430 2011. *Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução, de 13 de maio de 2011*. Provides for the conditions and standards for the discharge of effluents, complements and modifies Resolution No. 357/2005 [acessado 14 de Maio de 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>

Costa CR, Olivi P, Botta CMR., Espindola ELG 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quím Nova* 31:1820-1830.

Dellamatrice PM, Silva-Stenico ME, Moraes LAB, Fiore MF, Monteiro RT 2017. Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Braz J Microbiol* 48: 25-31.

Dobilaite V, Alisauskiene M, Saceviciene V 2017. Study of textile waste generation and treatment in Lithuania. *Fibres Text* 25:8-13.

EPA 2014. Textile Wastes. Environmental Protection Agency United States. [acessado 14 de Maio de 2018]. Disponível em: <http://www.epa.gov/wastes/conservation/materials/textiles.html>

Guaratini CCI, Zanoni MVB 1999. Corantes têxteis. *Quím. Nova.* 23:71 – 78.

Hao OJ, Kim H, Chiang PC 2000. Decolorization of wastewater. *Crit Rev Environ Sci Technol* 30:499-505.

Hendaoui K, Ayari F, Rayanaa IB, Amar R B, Darragi F, Ayadi MT 2018. Indigo dyeing effluent decontamination using continuous electrocoagulation cell: Study and optimization using Response Surface Methodology. *Process Saf Environ* 116:578-589.

Hessel C, Allegre C, Maisseu M, Charbit F, Moulin P 2007. Guidelines and legislation for dye house effluents. *J Environ Manag* 83:171-180.

Hussain T 2018. A critical review of the current water conservation practices in textile wet processing. *J Clean Prod* 198:806-819.

Kant R 2012. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Nat Sci* 4:22-26.

Karkmaz M, Puzenate E, Guillard C, Hermann JM 2004. Photocatalytic degradation of the alimentary azo dye amaranth - Mineralization of the azo group to nitrogen. *Appl. Catal. B-environ.*, 51:183-94.

Kunz A, Peralta-Zamora P, Moraes SG, Duran N 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Quím. Nova* 25:78-82.

Legrini O, Oliveros E, Braun AM 1993. Photochemical Process for Water Treatment. *Chem Rev* 93:671-698.

Lima, F; Ferreira, P. Índigo: Tecnologias – Processos – Tingimento – Acabamento. 1 ed. 118 p. Pernambuco, Recife, 2001.

Liu H, Yu H, Giesy JP, Sun Y, Wang X 2007. Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*) *Chemosphere* 66:2159-2165.

Luna LAV, Silva THG, Nogueira RFN, Kummrow, F, Umbuzeiro GA 2014. Aquatic toxicity of dyes before and after photo-Fenton treatment. *J Hazard Mat* 15:276-332.

Mansilla HD, Lizama C, Gutarra A, Rodríguez J. *Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil*. Faculdade de Ciências da Universidade Nacional de Engenharia – Peru. 2012.

Mantzavinos D, Psillakis E 2004. Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pretreatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 79:431-454.

Manu B. Physico-chemical treatment of indigo dye wastewater 2007. *Color Technol* 123:197-202.

Masutti MB 2004. *Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial e “in situ” (experimentos em micro e mesocosmos)*. Dissertação de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 390 pp.

Mckee JR, Zanger M 1991. A microscale synthesis of indigo: vat dyeing. *J Chem Educ* 68:242-244.

Mirjalili M, Nazarpour K, Karimi L 2011. Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye, *J Clean Prod* 19:1045-1051.

Novotný C, Dias N, Kapanen A, Malachová K, Ván-drovcová M, Itavaara M, Lima N 2006. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere*, 63:1436-1442.

Nimkar U 2018. Sustainable Chemistry A solution to the textil industry in a developin world. *Green Sustain Chem* 9:13-17.

Paschoal F. M.; tremiliose-filho, G. Eletrofoculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais. *Quim Nova*. 2005.

Peakall D. B; Hopkin, S. P.; Sibly, R. M.; Walker, C. H. *principles of ecotoxicology*. 4ed crc press 360p. new york, 2012.

Peres CS, Abrahão AJ 1998. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis – uma primeira abordagem. *Quím Têxtil* 52:22-39

Petrecă BB, Luiz DM, Arduin R. H 2008. *O refúgio da moda: um ensaio sobre a saturação do consumo na capital paulista*, Trabalho de Conclusão de Curso Universidade de São Paulo, São Paulo, 101pp.

Quintero, L.; Cardona, S 2009. Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín. *Dyna*, 77:371-386.

Rodrigues JAR 2013. *Uso de corantes de origem natural no tingimento de artigos têxteis de moda*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 128pp.

Saggiaro, EM 2014. *Efeito do dióxido de titânio na decomposição fotocatalítica de substâncias persistentes no ambiente: corantes têxteis e interferentes endócrinos*, Tese Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouco, Rio de Janeiro, 243pp.

Santos EO 2006. *Caracterização, biodegradabilidade e tratabilidade do efluente de uma lavanderia industrial*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 136pp. et al.

Scholz S. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – Applications beyond acute toxicity testing. *Environ c Pollut Res Int*, v. 15, n. 5, p. 394–404. 2008.

Sigma aldrich 2014. *Safety Data Sheet – Índigo Blue*. [acessado 20 de Janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=229296&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F229296%3Flang%3Dpt>

Sponza DT 2006. Toxicity of chemical due production industry in Turkey. *J Hazard Mater*, 138:p423-640.

Tastan BE, Ertugrul S, Donmez G 2010. Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus Versicolor*. *Bioresour. Technol.* 2010.

Tundisini JG, Matsumura TT 2011. Recursos Hídricos no século XXI. Oficina de Textos, São Paulo, 2011.

Twardokus, RG 2004. *Reúso de água no processo de tingimento da indústria têxtil*, Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 136pp.

Vacchi FI 2016. *Ocorrência, ecotoxicidade e risco ecológico de corantes no ambiente aquático*, Dissertação de Mestrado em toxicologia e análises toxicológicas, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 113 pp.

Vajnhandl S, Valh JV 2014. The status of water reuse in European textile sector. *J Environ Manag* 141:29-35.

Vautier M, Guillard C, Herrmann J 2001. Photocatalytic Degradation of Dyes in Water: Case Study of Indigo and of Indigo Carmine. *J Catal* 201:46-59.

Zagatto PA, Bertoletti E 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações, São Carlos, 478pp.

Zanoni VB, Yamanaka H 2016. *Corantes Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*, Editora UNESP, São Paulo, 344 pp.

Zhu X, Bao L, Wei Y, Ma J, Kong Y 2016. Removal of toxic indigo blue with integrated biomaterials of sodium carboxymethyl cellulose and chitosan. *Int J Biol Macromol* 91:409-415.

Zoolinger H 1991. *Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments* 2.ed., V. C. H, New York, 469pp.

CAPÍTULO 2: EFEITOS TÓXICOS DOS CORANTES ÍNDIGO SINTÉTICO E NATURAL SOBRE O CRESCIMENTO DE *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*

RESUMO

A indústria têxtil produz quantidades significativas de efluente, sendo os corantes, os principais poluentes visíveis. Diante do potencial poluidor do corante sintético índigo (amplamente utilizado para tingimento do “jeans”), foram realizados ensaios com a microalga *R. subcapitata*. O corante sintético Índigo Blue (pureza 95%) e o corante Índigo Natural, obtido da planta *Indigofera tinctoria* produzido na Índia, foram utilizados neste estudo na concentração de 100 mg/L. Os testes foram realizados em triplicata, o teste crônico foi conduzido dentro de incubadora com fotoperíodo e temperatura controlados. Foram retiradas duas amostras ao longo do experimento, uma após 72hs e outra após 96hs de cada réplica. A contagem de células algais foi feita com a câmara de Fuchs Rosenthal em microscópio de luz e a análise estatística utilizada foi KruskalWallis (software Biostat 5.0), comparando-se o número de células obtida na condição controle, com aquelas expostas aos corantes. Os inóculos expostos aos contaminantes, não apresentaram inibição de crescimento em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: inibição de crescimento, algas, índigo blue, *Indigofera tinctoria*.

1 - INTRODUÇÃO

As algas, como produtores primários, são importantes como indicadores biológicos, pois qualquer reposta que destoe da dinâmica de sua comunidade pode interferir nos níveis tróficos superiores (COSTA et al., 2008). A *Raphidocelis subcapitata* é uma alga unicelular de pigmentação verde, não flagelada amplamente utilizada em estudos de toxicidade por ser considerada de fácil cultivo e apresentar rápido crescimento (HOFFMAN et al., 1995).

O setor têxtil lança quantidades significativas de poluentes tóxicos no meio ambiente, comprometendo a saúde ambiental e humana (ZAMORA et al., 2002). Para se processar uma tonelada de tecido, utiliza-se cerca de 230 - 270 toneladas de água, gerando um efluente proporcional a essa quantidade (MIRJALILI et al., 2011).

Dentre os corantes têxteis, o índigo tem sua aplicação mais expressiva na indústria do jeans conferindo a famosa cor azul ao tecido, sendo amplamente difundido no setor têxtil (GUARATINI

& ZANONI, 2000; ZANONI & YAMANAKA, 2016). Para o tingimento, o índigo precisa ser reduzido a sua forma leuco com a ajuda de um solvente (característica dos corantes à tina), Industrialmente o diotinito de sódio é muito utilizado. Após fixada à fibra o corante sofre reoxidação e retorna a sua forma original, insolúvel (PASCOAL & TEMILLIOSE-FILHO, 2005). Com a industrialização e a descoberta da forma de produção sintética de índigo pelo alemão Adolf von Bayer, a empresa BASF viabilizou por volta de 1897 a produção de índigo sintético a preços mais baixos que era fabricado naturalmente a partir da planta *Indigofera tinctoria* (LIMA & FERREIRA, 2001). Segundo Quitero e Cardona (2009) a produção de índigo sintético chega a 17000 toneladas.

Para o Índigo Blue foi encontrado sobre ecotoxicidade, na ficha de informações de segurança da SIGMA ALDRICH (2014), a informação de que para algas clorófitas da espécie *Desmodesmus subspicatus* o valor de concentração de efeito, a CE50, referente a 100mg/L. Segundo Albuquerque (2009), 100mg/L é a concentração do corante índigo encontrado usualmente em efluentes têxteis

Um dos organismos mais utilizados para testes de ecotoxicidade de corantes são as algas verdes, em especial: *Raphidocelis subcapitata*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Selenastrum capricornutum*, nomes que designam a mesma espécie, frequentes em diversos estudos como bioindicador para análises ecotoxicológicas (KRIENITZ et al., 2011).

Diante do exposto este capítulo tem como objetivo avaliar o efeito tóxico provocado no crescimento da *R. subcapitata* quando exposta em teste crônico ao corante sintético Índigo Blue e ao corante Índigo Natural, obtido da planta *Indigofera tinctoria*, sob exposição crônica.

2 – METODOLOGIA

2.1 - Cultivo do organismo teste

O cultivo da microalga *R. subcapitata* foi realizado segundo condições descritas na norma ABNT 12648 (2018), no Laboratório de Toxicologia e Histologia (LATHIS) da UNESP Instituto de Ciência e Tecnologia Campus Sorocaba (ICTS-UNESP). A amostra de *R. subcapitata* foi doada pelo laboratório de Microbiologia e Micropropagação - GEA UNESP Sorocaba. Utilizou-se o meio de cultura líquido do tipo L.C. Oligo para cultivo, preparado a partir de 7 soluções contendo nutrientes selecionados para o desenvolvimento das algas. Na Tabela 1 encontram-se as soluções necessárias para preparo de 1 litro de Meio de Cultura L. C. Oligo.

Tabela 1 – Meio de Cultura L. C. Oligo

Solução	Volume (mL)	Reagente	Quantidade (g)	Preparo
1	1	Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	4,0	Dissolver e completar para 100ml com água processada
2	1	KNO ₃	10,0	Dissolver e completar para 100ml com água processada
3	1	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,0	Dissolver e completar para 100ml com água processada
4	1	K ₂ HPO ₄	4,0	Dissolver e completar para 100ml com água processada
5	0,5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,03	Dissolver e completar para 1000ml com água processada
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,06	
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,06	
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,06	
		Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,06	
		C ₆ H ₈ O ₇	0,06	
		H ₃ BO ₃	0,06	
6	0,5	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	1,625	Dissolver e completar para 1000ml com água processada
		FeCl ₃ .6H ₂ O	0,625	
		FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,625	
7	1	NaHCO ₃	15,0	Dissolver e completar para 1000ml com água processada

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 12648 (2018)

O meio L. C. Oligo foi preparado em um balão volumétrico de 1 Litro, a solução foi mantida em agitação magnética por cerca de 1 hora com o auxílio da barra magnética. O pH é ajustado para manter-se entre 6,0 e 8,0 utilizando-se ácido clorídrico (HCl 0,1M). O meio é disposto em erlenmeyers de 100 ml, os quais são em seguida autoclavados a uma temperatura de 121 °C por 15 minutos ao atingir esta temperatura e, após resfriamento o repique para a maximização da cultura é realizado. Esse procedimento é repetido semanalmente. A cultura é armazenada em incubadora e são mantidas em fotoperíodo de 12h, à 23°C±2 e agitadas manualmente uma vez ao dia para garantir aeração.

2.2 - Ensaio de toxicidade

O teste de sensibilidade foi realizado previamente no laboratório Microbiologia e Micropropagação – GEA UNESP que, na sequência doou as algas para este estudo. Portanto não foi necessário realizar novo teste de sensibilidade para este experimento.

Uma semana antes do teste crônico, foi preparada a pré-cultura segundo recomendações da NBR 12648 (2018). Após sete dias de crescimento, centrifugou-se a pré cultura para retirada do sobrenadante e concentração de células. Foi utilizada uma Câmara de Uthermol e um microscópio invertido para contagem de células em suspensão após centrifugação. Para evitar contaminação, todo o procedimento para preparo do inóculo foi realizado em ambiente higienizado e esterilizado, dentro de câmara com fluxo laminar.

A quantidade de inóculo do organismo teste *R. subcapitata* foi calculado através da Equação 1.

Equação 1 – Determinação de volume algal para inóculo do teste.

$$Vi = \frac{Vf \times Ci}{N} \quad (1)$$

Onde:

“Vi” é o volume do inoculo, expresso em mililitros (mL);

“Vf” é o volume final da solução-teste, expresso em mililitros (mL);

“Ci” é a concentração inicial no recipiente-teste, expressa em células/mL;

“N” é o número de células da suspensão, expressa em células/mL

Os ensaios com a microalga *R. subcapitata* foram efetuados utilizando-se a concentração de 100mg/L, tanto para o corante sintético Índigo Blue (pureza 95%, adquirido da empresa Sigma Aldrich®) quanto para o corante Índigo Natural obtido da planta *Indigofera tinctoria* produzido na Índia (doador pela empresa de tingimento natural Ai Ginska®). Em erlenmeyers (de 100mL) devidamente descontaminados e previamente esterilizados, foram inseridos 50 mL de meio de cultivo L. C. Oligo. Cada tratamento foi feito em triplicata sendo: controle (apenas meio de cultivo), contaminado com Índigo Blue (5mg do corante homogeneizado com o meio de cultivo,

para obter-se a concentração equivalente a 100mg/L) e contaminado com Índigo Natural (5mg do corante homogeneizado com o meio de cultivo para obter-se a concentração equivalente a 100mg/L). Os frascos foram autoclavados e esfriaram em câmara de fluxo laminar com luz UV ligado por 45 minutos. O inóculo entre 0,1 e 1,0 mL, foi calculado através da já citada Equação 1.

As amostras foram mantidas sob agitação e luz (superior a 4500 lux) constante em mesa agitadora com controle de agitação e temperatura, procedendo-se com troca de posições dos recipientes teste de maneira aleatória a cada 24 horas conforme recomendações da ABNT NBR 12648 (2018). Foram retiradas amostras de cada réplica após 72hs e após 96hs, as quais foram fixadas em lugol para posterior contagem.

2.3 - Quantificação

A câmara de Fuchs Rosenthal possui 16 quadrados de 1,0 mm (área de 1,0 milímetro quadrado), cada quadrado possui 16 subdivisões menores, sendo um total de 256 quadrados. A câmara possui 0.2 mm de profundidade e volume total de 3.2 milímetros cúbicos. Foram contados 10 quadrados (dos menores) para cada réplica.

2.4 - Análise estatística

Aos valores de contagem obtidos foram analisados estatisticamente através do software Bioestat 5.0 (Ayres, 2007), verificando-se através da análise de variância de Kruskal Wallis, diferença significativa entre os tratamentos (valor p) para identificação de toxicidade.

3- RESULTADOS

O valor obtido de p, quando comparado, as réplicas do controle com as do Índigo Blue e do Índigo Natural, foi de 0,1133, o que indica não significância nos resultados obtidos nos diferentes tratamentos. Aplicada separadamente a estatística de análise de variância os valores de p foram: 0,1017 (avaliando controle com tratamento de Índigo Blue); 0,3679 (avaliando controle e Índigo Natural), também indicando não significância. Na Tabela 2, seguem as médias de concentração algal de cada tratamento.

Tabela 2 - Resultados ensaio de toxicidade após 72hs

Amostra	Média da concentração (células/mL)
Controle	1352800
Índigo Blue	1628800
Índigo Natural	1292800

Fonte: Autoria própria

Os resultados pós 96hs estão apresentados na Tabela 3. Neste caso para a análise estatística de KruskalWallis entre os dados dos 3 tratamentos, obteve-se $p=0,0390$. Mas quando analisados separadamente Controle e Índigo Blue apresentam $p=0,1017$, controle e Índigo Natural $p=0,1017$, Índigo Blue e Índigo Natural $p=0,1561$.

Tabela 3 - Resultados ensaio de toxicidade após 96hs

Amostra	Média da concentração (células/mL)
Controle	1881600
Índigo Blue	1828800
Índigo Natural	3031200

Fonte: Autoria própria

O ensaio mostrou que a presença dos corantes, na concentração de 100mg/L, tanto sintético como natural não inibiram o crescimento do organismo-teste *R. subcapitata*.

4 - DISCUSSÃO

Os tratamentos não apresentaram variação significativa em relação ao controle mostrando que na concentração deste trabalho, os contaminantes em estudo não provocaram toxicidade ao organismo *R. Subcapitata*. Na Ficha de Segurança do Produto Químico (FISPQ) da SIGMA ALDRICH (2014) do corante sintético, Índigo Blue, utilizado para o presente estudo, o único valor de concentração de efeito para se ter uma referência foi de 100mg /L porém para outra espécie, *Desmodesmus subspicatus*. Organismos diferentes possuem respostas e sensibilidades diferentes quando expostos a mesmos contaminantes. Diante da escassez de informações para o corante índigo foram procurados estudos com o organismo-teste *R. subcapitata* exposto a outros corantes de utilização têxtil. Destaca-se que maioria dos organismos utilizados em testes com corantes até o presente momento foram os microcrustáceos da classe Cladocera e as algas verdes (VACCHI, 2016), que tiveram sua nomenclatura alterada recentemente, sendo que *Selenastrum capricornutum*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Raphidocelis subcapitata* representam a mesma espécie (KRIENITZ et al., 2011).

Cada corante, independente de sua classificação, provoca em diferentes espécies respostas diferente aos bioensaios, portanto cada caso deve ser avaliado separadamente. Novotný et al. (2008) e Luna et al. (2014) realizaram estudos com corantes têxteis utilizando o organismo *R. subcapitata*, a Tabela 4 apresenta os valores que promoveram inibição de crescimento nos ensaios.

Tabela 4 - Inibição de crescimento de *R. subcapitata* exposta a corantes têxteis

Corante	Classe química	Resultado (mg/L)	Referência
Presente estudo com Índigo Blue	indigoide	CI50(96h) > 100	MOREIRA, 2019
Presente estudo com Índigo Natural (planta Indigofera tinctoria)	indigoide	CI50(96h) > 100	MOREIRA 2019
Acid Orange 7	Azo	CI50(72h) => 100	LUNA et al., 2014
Direct Red 28	Azo	CE50(96h) = 4,8	NOVOTNÝ et al., 2008
Disperse Blue 3	Antraquinona	CE50(96h) = 0,5	NOVOTNÝ al., 2008
Reactive Black 5	Azo	CI50(72h)= 29	LUNA et al., 2014
Reactive Orange	Azo	CE50(96h) = 7,8	NOVOTNÝ al., 2008
Remazol Brilliant Blue	Antraquinona	CE50(96h) = 81,1	NOVOTNÝt al., 2008
Vat Green 3	Vat	CI50(72h)=5,6	LUNA et al., 2014

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 4 observa-se que maioria dos corantes pertence a classificação Azo, mas a concentração que inibe o crescimento para cada corante é diferente quando utilizado o mesmo organismo teste. Por exemplo, o corante O Direct Red 28 e o Acid Orange mesmos pertencendo a mesma classificação de corantes apresentam concentração de efeito diferentes. O Direct Red 28, numa concentração de apenas 24,8 mg/L já induz a inibição do crescimento de *R. subcapitata* enquanto que o corante Acid Orange, da mesma classe química, precisa estar numa concentração maior que 100mg/L para inibir o crescimento. Portanto não é possível generalizar uma concentração segura levando-se em conta apenas a classe a qual um corante pertence, pois cada corante independente da sua classificação trará respostas específicas em testes de toxicidade. Também não é possível relacionar a cor do corante ao efeito, visto que o azul Remazol Brilhante

Blue a uma concentração de 81,1mg/L inibe o crescimento, o corante Índigo Blue, também azul, na concentração de 100mg/L não provoca esta inibição de crescimento para a alga da mesma espécie conforme observado neste estudo.

Há estudos recentes que indicam a capacidade da alga *R. subcapitata* em remover contaminantes orgânicos. Foi relatado por Chan et al. (2010) o potencial desta alga para remover e degradar o fenantreno e o fluoranteno. Em estudo recente de Liu et al. (2018) verificou-se o potencial desta espécie para a remoção de estrogênio. Diante de resultados positivos a outros contaminantes a espécie *R. subcapitata* por não apresentar toxicidade quando exposta aos corantes Índigo Blue e Índigo Natural (para concentração de 100mg/L), pode ser em futuros estudos analisada sob a ótica do potencial biorremediador.

Observa-se que algas tem sido usadas para a remoção de cor em efluentes, o mecanismo envolve biosorção e bioconversão. Nos últimos anos a utilização de microalgas para biorremediação atraem o interesse de pesquisadores, bem como pelo seu potencial de biomassa para produção de energia (HUANG et al., 2010). A biosorção pode ser utilizada para remoção de corantes por meio de biomassa de algas, leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Os tratamentos biológicos apresentam grande interesse por representarem uma solução de custo mais acessível (ROBINSON et al., 2001).

5 - CONCLUSÃO

Nos ensaios com *R. subcapitata* expostas aos contaminantes Índigo Blue como ao Índigo Natural, não houve inibição na concentração de 100mg/L. Portanto, os corantes não foram tóxicos à alga na concentração e para o endpoint estudados.

REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648:** ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com algas (Clorophyceae). 2. ed. Rio de Janeiro, 2018.
- ALBUQUERQUE L. F. **Aplicação de água residuária das salinas no tratamento de efluente têxtil.** Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais). 170 f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2009.
- CHAN S. M.; LUAN, T.; WONG M. H.; TAM N. F. Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. **Environ. Toxicol. Chem.** , v.25, p. 1772-1779, 2010.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**, v.31, n.7, p. 1820-1830, 2008.
- AYRES, M. Bio Stat 5.0 - Computacional program (2007).
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Quím. Nova**. v. 23, n. 1, p. 71 – 78., 2000.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI D.; ZHANG, X; CHEN G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Appl. Energy**. v.87, p38-46. 2010.
- HOFFMAN, D.J.; BURTON JR., G.A.; CAIRNS JR., J.; RATTNER, B.A.; **Handbook of ecotoxicology**. Ed. 1. CRC Press. EUA. 1995.
- KRIENITZ, L.; BOCK, C; NOZAKI, H.; WOLF, M. SSU rRNA gene phylogene of morphospecies affiliated to the bioassay alga "Selenastrum capricornatrum" recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped Chlorophyta. **J. Phycol**, v. 47, n.4, p.880-93, 2011.

LIMA, F; FERREIA, P. Índigo: Tecnologias – Processos – Tingimento – Acabamento. 1 ed. 118 p. Pernambuco, Recife, 2001.

LUNA. L. A. V.; SILVA, T. H. G.; NOGUEIRA, R. F. N.; KUMMROW, F.; UM-BUZEIRO, G. A. Aquatic toxicity of dyes before and after photo-Fenton treatment. **J. Hazard.Mater..** 2014.

LIU, W; CHEN, Q.; HE, N.; SUN, K.; SUN, D.; WU, X.; DUAN, S. Removal and Biodegradation of 17 β -Estradiol and Diethylstilbestrol by the Freshwater Microalgae *Raphidocelis subcapitata*. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 2018.

MIRJALILI, M.; NAZARPOOR, K ; KARIMI, L. Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye, **J. Clean. Prod.** pp. 1045-1051, 2011.

NEVOTNÝ C.; DIAS, N.; KAPANEN, A.; MALACHOVÁ, K.; VÁN-DROVCOVÁ, M.; ITAVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v.63, n.9, p.1436-42, 2006.

PASCHOAL F. M.; TREMILIOSE-FILHO, G. Eletrofoculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais. **Quim. Nova**. 2005.

QUINTERO, L.; CARDONA, S. Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín. **Dyna**, v. 77, n. 162, p. 371 – 386, 2009.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresour. Technol.**, v. 77. 2001.

SIGMA ALDRICH. **Safety Data Sheet – Índigo Blue**. 2014. Disponível em:<
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=229296&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F229296%3Flang%3Dpt>>. Acesso em: 15 de Jan. 2018.

VACCHI, F. I. **Ocorrência, ecotoxicidade e risco ecológico de corantes no ambiente aquático.** 2016. Tese (Doutorado em toxicologia e análises toxicológicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo, 2016.

ZAMORA P.; KUNZ, A.; MORAES S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quím. Nova**,v.25, p. 78 – 82. 2002.

ZANONI, V. B; YAMANAKA, H. (Orgs). **Corantes Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento.** São Paulo: Editora UNESP, 2016.

CAPÍTULO 3: EFEITOS TÓXICOS DOS CORANTES ÍNDIGO SINTÉTICO E ÍNDIGO NATURAL SOBRE A REPRODUÇÃO DE *DANIO RERIO*.

RESUMO

Dentre os corantes têxteis, o índigo tem sua aplicação mais expressiva na indústria do jeans, sendo amplamente difundido no setor têxtil. O corante sintético Índigo Blue (pureza 95%) e o corante Índigo Natural obtido da planta *Indigofera tinctoria* foram estudados na concentração de 100 mg/L expondo-se o organismo-teste *D. rerio* objetivando-se compreender se ambos corantes oferecem risco a fauna aquática. Diante da importância da reprodução para a manutenção das espécies, testes crônicos foram realizados com fêmeas e machos adultos de *D. rerio*, para cada tratamento foram expostas duas réplicas contendo duas fêmeas cada e duas réplicas contendo quatro machos cada, ao final do vigésimo dia deste estudo foi realizada reprodução para avaliação dos endpoints (número de ovos, viabilidade dos mesmos e sobrevivência de larvas) após exposição aos contaminantes, e após mais 21 dias em contato com água limpa os mesmos organismos foram submetidos a nova reprodução para avaliação do potencial de recuperação biológica analisando-se os mesmos parâmetros. Para análise do biomarcador histológico gônadas de machos e fêmeas foram utilizados quatro réplicas por sexo em cada tratamento (duas réplicas foram sacrificadas no vigésimo primeiro dia, e duas réplicas de cada tratamento seguiram por período de mais 21 dias apenas em água de cultivo). Os endpoints do experimento de reprodução foram analisados estatisticamente com o Teste do Qui quadrado e indicaram toxicidade para a exposição tanto ao corante sintético como ao natural. Análises histológicas de gônada feminina mostraram predominância de fases avançadas de maturação tanto para os organismos expostos ao Índigo Blue como aos expostos ao Índigo Natural. No caso das gônadas masculinas não foram observadas alterações significativas aos organismos expostos ao índigo Natural, mas nos organismos expostos ao Índigo Blue há predomínio de espermatozóides. Observou-se potencial para recuperação biológica tanto nas respostas imediatas a reprodução como nas análises histológicas. Conclui-se que ambos os corantes apresentaram ecotoxicidade crônica ao observar-se os aspectos reprodutivos da espécie e em condições livre de exposição, os organismos apresentam potencial de recuperação biológica.

Palavras-chave: *Indigofera tinctoria*, Índigo Blue, zebrafish, gônadas, histologia, recuperação biológica.

1 – INTRODUÇÃO

Estudos ecotoxicológicos têm demonstrado que a exposição dos organismos aquáticos aos diferentes tipos de efluentes industriais apresenta potencial para desencadear efeitos agudos e crônicos, e portanto, devem ser estudados e processados para que, uma vez lançados no ambiente, sejam seguros para a proteção da vida aquática. Nesse aspecto, os bioensaios são recomendados para avaliação de efluentes pois refletem o impacto real de poluentes em mistura aos organismos expostos (RODRIGUEZ et al., 2006).

O setor têxtil lança quantidades significativas de poluentes tóxicos no meio ambiente, comprometendo a saúde ambiental e humana (ZAMORA et al., 2002). Dentre os corantes têxteis, o índigo é muito utilizado e tem sua aplicação mais expressiva na indústria do jeans, conferindo a cor azul ao tecido, e sendo amplamente difundido no setor têxtil (GUARATINI & ZANONI, 2000; ZANONI & YAMANAKA, 2016). O corante comercial Índigo Blue tem fórmula molecular $C_{16}H_{10}O_2N_2$, reproduzindo o mesmo corante obtido na natureza da planta *Indigofera tinctoria*.

Os corantes menos solúveis, característica à qual o índigo se enquadra, tendem a apresentar maior toxicidade pois são mais propícios a serem absorvidos pelos organismos pois os corantes menos solúveis têm mais chance de entrarem para a cadeia alimentar, sendo ingeridos diretamente. Sua persistência e consequente longo tempo de exposição são particularmente preocupantes para a descarga de efluentes de corantes residuais, uma vez que essas substâncias podem exibir efeitos crônicos à biota (KLAASSEN; CASARETT; DOULL, 2013; ZANONI & YAMANAKA, 2016).

Em ambientes aquáticos os peixes são organismos facilmente atingidos por substâncias químicas, sendo que seus impactos podem ser facilmente evidenciados pelo estudo de sua fisiologia (JOBLING & TYLER, 2006). Para estudos ecotoxicológicos um dos organismos-teste utilizados mundialmente é o *Danio rerio*, peixe originário da Índia, também conhecido como zebrafish por suas listras laterais. O *D. rerio* é um modelo atrativo tanto para o estudo de toxicidade para humanos como para a biota, pois apresenta desenvolvimento e manipulação fácil em laboratório e transparência embrionária (SCHOLZ et al., 2008).

O efeito biológico frente a exposição a contaminantes refletem a interação entre a substância e as células do organismo que podem ocasionar modificações morfológicas ou fisiológicas que a longo prazo podem impactar a capacidade reprodutiva da espécie (HINTON,

1994). Nesse sentido, os biomarcadores histológicos são facilmente identificados e analisados a partir de dados de controle e referências (FATIMA; USMANI; HUSSAIN, 2014).

A presente pesquisa tem como objetivo a avaliação ecotoxicológica dos corantes Índigo Blue e Índigo Natural no que diz respeito aos aspectos de reprodução de *D. rerio*, utilizando os endpoints: quantidade de ovos viáveis após reprodução, taxa de eclosão, sobrevivência das larvas eclodidas até o sétimo dia e histologia de gônadas de fêmeas e machos adultos. Ao final, pretende-se responder as seguintes questões: a) o corante índigo natural é uma opção que não gera impactos ecotoxicológicos quando comparado ao sintético? b) No caso do comprometimento reprodutivo da espécie em estudo, pode-se justificar pelo aspecto ecotoxicológico ou apenas pelo impacto físico que o uso dos corantes testados representa ao ambiente aquático? c) retornando à condições de água não contaminada, os organismos apresentam potencial de recuperação biológica? Se sim, essa recuperação é suficiente para retornar as condições iniciais equiparando-se ao grupo controle?

2 - METODOLOGIA

2.1 Manutenção do organismo teste

O cultivo do organismo *D. rerio* está foi realizado no Laboratório de Toxicologia e Histologia de Contaminantes Ambientais (LATHIS) da UNESP Instituto de Ciência e Tecnologia Câmpus Sorocaba (ICTS-UNESP) sob condições ambientais recomendadas pela ABNT NBR 15088 (2011). A alimentação dos peixes foi realizada duas vezes ao dia com ração comercial TetraMin® com 97% de proteína bruta, “ad libitum”. Em laboratório, os indivíduos adultos foram sendo mantidos em aquários de 20 L, mantendo-se a proporção 1 g de peixe / litro de água em sala climatizada com fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro, pH neutro entre 6,8 – 7,2, e temperatura ambiente entre 25±2 °C.

A água de cultivo foi preparada a partir de água de torneira desclorada e previamente filtrada (filtros acoplados nos aquários de água de cultivo constituídos de carvão ativado e por tela do tipo silk screen com abertura de malha de 25 µm). A água de cultivo foi monitorada semanalmente quanto aos parâmetros químicos dureza, pH e concentração de oxigênio dissolvido, quepara manter os valores de 44 mg.L⁻¹; entre 6,8 e 7,2; e acima de 4 mg.L⁻¹, respectivamente. Tais parâmetros da água também foram controlados no período dos testes.

2.2. Teste de degradação dos corantes

Previamente foi realizado um estudo de degradação dos corantes para definir a frequência das trocas de água dos aquários. Foram montados três réplicas com aquário de dois litros na concentração de 100mg/L de corante Índigo Blue e três réplicas em concentração de 100 mg/L de Índigo Natural expostos na sala de fotoperíodo de 12hs. Os aquários foram mantido por 96hs e foram retiradas alíquotas de 24 em 24 horas para leitura da absorvância em espectrofotômetro (marca HACH). Para realização correta das leituras, previamente foi realizada uma curva de calibração para cada corante a partir das concentrações, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 mg/L.

2.3 Bioensaios ecotoxicológicos agudos de caráter preliminar

Para os testes de ecotoxicidade utilizou-se uma concentração de 100 mg/L, que segundo literatura é a concentração média de corantes encontrados em efluentes (ALBUQUERQUE, 2009). Com base nessa concentração, um teste ecotoxicológico agudo preliminar foi realizado a fim de identificar se esta era uma concentração não letal para exposição do organismo adulto *D. rerio* e assim utilizá-la posteriormente no teste crônico. Para o teste agudo foram utilizadas seis concentrações (25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 mg/L). O controle experimental foi realizado com água reconstituída a partir de água de torneira desclorada segundo recomendações da ABNT 15088 (2011). O experimento foi conduzido em duplicata por 96 horas e sendo realizada renovação da soluções testes após 48 hs, conforme recomendação da norma ABNT 15088 (2011).

2.4 Teste crônico

Com o intuito de avaliar os efeitos ecotoxicológicos crônicos do corante sintético Índigo Blue e confrontar os resultados com o corante Índigo Natural, bem como analisar a capacidade dos organismos de recuperar-se biologicamente após exposição, foram realizados os experimentos conforme o fluxograma da Figura 1.

Figura 1 - Desenho experimental.



Fonte: Autoria própria.

Machos e fêmeas adultos (com mais de 3 meses de idade) da espécie de peixe *D. rerio* foram submetidos a um teste de exposição crônica com o corante sintético Índigo Blue (pureza 95%, obtido da empresa Sigma Aldrich) e o corante Índigo Natural obtido da planta *Indigofera tinctoria* produzido na Índia (doado pela empresa de tingimento natural Ai Ginska), ambos os contaminantes na concentração de 100mg/L, como referência de Albuquerque (2009). O teste teve duração inicial de 21 dias, seguindo-se recomendações de OECD (2010) em regime semi-estático (com trocas da solução teste a cada 72h, após análise de degradação descrita no item 2.2) para avaliação dos contaminantes e depois seguiu por mais 21 dias sem a presença dos mesmos para análise do potencial de recuperação biológica dos organismos.

2.4.1 – Análise Qualitativa da Histologia de Gônadas de *D. rerio*

Para a análise histológica os organismos foram mantidos durante 21 dias separados por sexo, sendo montadas 4 réplicas contendo 3 machos em cada (n=12) e 4 réplicas contendo 3 fêmeas

(n=12) para cada tratamento: exposição ao Índigo Blue, exposição ao Índigo Natural e situação controle (organismos expostos apenas a água de cultivo). Após 21 dias de experimento os organismos de duas réplicas de cada sexo e de cada tratamento e controle foram eutanasiados e fixados em formol a 10% por 12 horas em temperatura ambiente, seguindo-se a lavagem em água corrente por 10 min, depois foram mantidos em frasco âmbar com álcool 70%. Posteriormente os tecidos seguiram para o processador de tecidos automático – San Pietro (marca O Patologista) onde banhos de uma hora cada foram programados para: sete submersões em álcool etílico absoluto, três submersões em xilol e duas submersões em parafina histológica. Para retirada da parafina residual do processamento foi utilizada a placa aquecedora, para que os organismos fossem reinseridos em parafina de maneira homogênea terminando a etapa de emblocamento com a placa resfriadora resfriadora (ambas as placas também da marca O Patologista). Os tecidos para análise em lâminas histológicas permanentes foram obtidos por cortes (4 µm) com navalha de aço, em micrótomo (micron HM340E) e corados com hematoxilina-eosina (HE) e lamínulas coladas com Entellan. A análise qualitativa dos tecidos das gônadas de fêmeas e machos foi feita em microscópio óptico (marca MOTIC). As imagens foram obtidas com o programa ZEN no microscópio Axio Scope A1. Os resultados foram analisados qualitativamente com baseados nos parâmetros para análise de gônadas da OECD (2010).

As duas réplicas restantes de cada tratamento permaneceram por mais 21 dias em água de cultivo não contaminada em condições igual a do controle na primeira parte do experimento, seguindo-se o regime semi-estático, a água era trocada também de três em três dias. Ao final do quadragésimo segundo dia de experimento os organismos das réplicas destinadas a recuperação biológica foram eutanasiados e seguiram para os mesmos processos necessários a análise histológica descritos anteriormente.

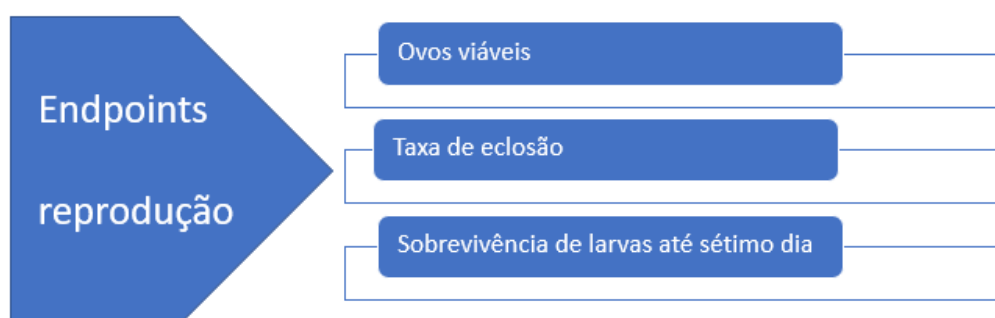
2.4.2 - Análise dos efeitos reprodutivos imediatos: número de ovos da postura, ovos viáveis, taxa de eclosão e sobrevivência de larvas

Para avaliação dos efeitos reprodutivos, duas réplicas para cada tratamento foram mantidas com 4 machos (n=8) e duas réplicas para cada tratamento foram mantidas com 2 fêmeas (n=4) ao longo dos 21 dias. Sendo que nos últimos sete dias do experimento foram adicionadas à alimentação artêmias vivas para estimular a reprodução. Ao fim do vigésimo primeiro dia, os organismos testes foram introduzidos em aquários de acasalamento com água contaminada pelos corantes em estudo, cada um com duas réplicas, e igualmente com o controle. Em cada aquário de reprodução foram colocados dois machos e uma fêmea conforme recomendação da norma ABNT NBR 15499 (2015). Para a montagem dos aquários de

reprodução foi utilizado o tecido tule, como proteção de fundo, evitando-se que após postura dos ovos os organismos adultos tivessem contato com os mesmos, eliminando o problema de possível predação. Aquecedores foram mantidos submersos para elevar a temperatura em 2 °C. A junção de machos e fêmeas adultos nos aquários de reprodução foi feita ao final da tarde e os ovos foram recolhidos no dia seguinte.

Imediatamente após desova, os ovos foram recolhidos com auxílio de pipetas de pasteur, um a um, retirando-se os ovos inviáveis (por exemplo: presença de alguma deformidade ou fungo) e coagulados (caracterizados por aspecto branco e opaco), realizando-se as contagens e seguindo-se o processo de lixiviação para eliminação de fungos e protozoários. Esse procedimento de limpeza, denominado de lixiviação, foi feito utilizando-se uma rede de aquário, na qual todos os ovos viáveis de cada aquário foram coletados, e mergulhados em uma cubeta contendo solução de água de cultivo com 0,0025% de água sanitária para banho por um minuto, seguindo por lavagem em água de cultivo em quatro cubetas ficando dois minutos em cada. São considerados ovos viáveis os que apresentam-se translúcidos ao longo do desenvolvimento do embrião. Os ovos viáveis e larvas obtidos nessa etapa foram mantidos no mesmo tratamento que se encontravam os genitores: Controle, exposição a 100mg/L de Índigo Blue, e exposição a 100mg/L de Índigo Natural. Após a eclosão foi avaliada a sobrevivência das larvas até o sétimo dia, sendo os principais endpoints dessa etapa são destacados na Figura 2 a seguir.

Figura 2 – Endpoints avaliados ao final das reproduções.



Fonte: Autoria própria.

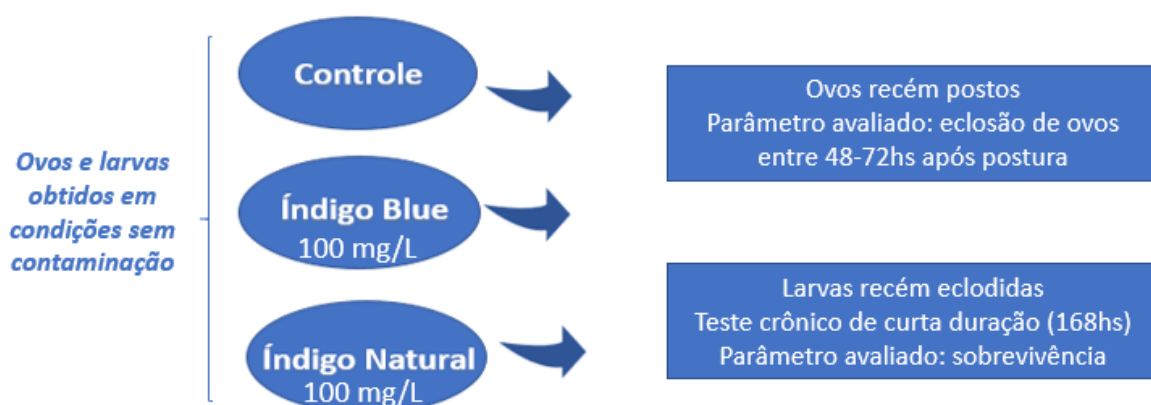
Os organismos adultos utilizados nesta etapa permaneceram vivos e retornaram ao experimento por mais 21 dias todos eles em água de cultivo trocada de três em três dias. Repetiu-se no quadragésimo segundo dia de experimento a reprodução para avaliação do potencial de recuperação biológica, ovos e larvas seguirão também para avaliação de eclosão

de ovos e sobrevivência de larvas até o sétimo dia, mantidos apenas em água de cultivo, não contaminada.

2.5 - Testes ecotoxicológicos com embriões e larvas de *Danio rerio* obtidos em situação controle e posteriormente expostos aos contaminantes

Foram realizados teste com embriões obtidos de situação controle bem como testes crônicos de curta duração com larvas (168 hs) com larvas também obtidas em situação experimental em água não contaminada conforme fluxograma da Figura 3.

Figura 3 - Testes com exposição aos contaminantes a partri de diferentes estágios.



Fonte: Autoria própria.

O teste com ovos (embriões) de *D. rerio* seguiu determinação da norma OECD 236/2013 expondo os organismos aos contaminantes em menos de duas horas após sua postura. Foram montadas quatro réplicas para cada tratamento e controle, com cinco ovos cada réplica. Diariamente foi retirado os ovos coagulados e inviáveis e realizada a lixiviação anteriormente descrita. Foi observada a eclosão de ovos entre 48hs-72hs (tempo normal para ocorrer a eclosão segundo a norma ABNT NBR 15499).

As larvas recém eclodidas, por apresentarem saco vitelínico, não precisam ser alimentadas até o sétimo dia. Por conta disso o teste crônico de curta duração com larvas segue sem alimentação das mesmas. O teste de 168hs seguiu norma ABNT NBR 15499 (2015). Larvas obtidas de acasalamento de *D. rerio* não expostos a contaminantes foram expostas nas primeiras 24 horas de vida a 100mg/L de cada contaminante. Dez larvas foram dispostas em cada réplica e quatro réplicas foram montadas para cada tratamento. A sobrevivência de larvas foi avaliada diariamente até o sétimo dia.

2.6 - Análise estatística

Os parâmetros quantitativos avaliados da etapa de reprodução foram: a quantidade de ovos postos por fêmeas, taxa de eclosão e sobrevivência das larvas eclodidas até o sétimo dia.

A resposta do experimento pela desova foi analisada com o teste do Qui quadrado aplicado a ovos viáveis e inviáveis, ovos eclodidos em relação a desova. Para o teste com larvas e embriões a estatística utilizada foi o teste de Kruskal Wallis, para analisar os parâmetros de sobrevivência e de eclosão. O programa utilizado para realizar as análises do Qui quadrado e Kruskal Wallis foi o Biostat (Ayres, 2007).

3 - RESULTADOS

3.1 - Reprodução, postura de ovos, eclosão e sobrevivência de larvas

Do estudo de degradação, observou-se que os corantes eram persistentes podendo ser realizada a troca de água dos aquários ao longo do teste crônico com uma frequência de três em três dias, a fim de manter uma concentração constante de exposição e evitando o acúmulo da amônia que os peixes eliminam.

O teste ecotoxicológico agudo preliminar não apresentou efeitos letais em nenhuma das concentrações de exposições, sendo que a maior concentração (1600 mg/L) era 16 vezes superior a concentração da proposta desta pesquisa (100 mg/L), o que abriu uma margem de segurança para dar sequência a exposição crônica. Com o teste preliminar assegurando que esta concentração de 100mg/L não é letal, deu-se continuidade aos testes crônicos na exposição, tanto para o corante Índigo Blue quanto para o Índigo Natural para comparar os efeitos em relação aos aspectos reprodutivos.

Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos após reprodução dos organismos expostos por 21 dias aos contaminantes. Foram observados de imediato efeitos sobre a reprodução relativos ao aspecto e número de ovos (totais e viáveis), tanto na reprodução obtida nas réplicas do Índigo Blue em que não apresentou nenhum ovo viável, como nas réplicas do Índigo Natural, que apesar de apresentar desova com 115 ovos (o que representa 21,8% quando comparada ao controle), houve apenas 10 ovos viáveis (o que representa 1,9% comparando ao número obtido no controle).

Tabela 1 - Resultados reprodutivos brutos após exposição aos contaminantes.

Parâmetros	Controle	Índigo Blue	Índigo Natural
ovos	625	48	115
ovos viáveis	528	0	10
ovos inviáveis	97	48	105
larvas eclodidas	470	0	4
sobrevivência pós sete dias	466	0	3

Fonte: Autoria própria.

O corante sintético Índigo Blue apresentou efeitos acentuados sobre a reprodução do *D. rerio* pois não houve ovos viáveis, efeito semelhante observou-se com a exposição ao Índigo Natural, com somente 10% de viabilidade dos ovos em uma das réplicas e uma taxa de eclosão de larvas de apenas 40% destes ovos, conforme observa-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Taxa de ovos, eclosão e sobrevivência de larvas por réplica após exposição aos contaminantes.

Pós exposição aos contaminantes	Controle		Índigo Blue		Índigo Natural	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
	C	C	IB	IB	IN	IN
ovos viáveis	80%	88%	0%	0%	10%	0%
eclosão considerando número de ovos viáveis	100%	81%	0%	0%	40%	0%
sobrevivência de larvas	98%	100%	0%	0%	75%	0%

Fonte: Autoria própria.

Legenda: R1 Réplica 1, R2 Réplica 2, C – Controle, IB – Índigo Blue, IN - Índigo Natural.

Após a recuperação biológica foram obtidos os seguintes resultados reprodutivos brutos conforme Tabela 3. A quantidade de ovos foi 7,5 vezes maior para a recuperação biológica pós exposição ao Índigo Blue; e 5,5 vezes maior para a recuperação biológica pós exposição ao Índigo Natural, o que demonstra o potencial de recuperação dos organismos quando a exposição aos corantes é cessada. A sobrevivência de larvas, comparando-se o número de larvas vivas no sétimo dia com o número de larvas eclodidas, foi de 97,6%, 98,6% e 98% para Controle, Índigo Blue e Índigo Natural, respectivamente.

Tabela 3 - Resultados reprodutivos brutos pós período de recuperação biológica.

Parâmetros	Controle	Índigo Blue	Índigo
	Rec	Rec	Natural Rec
ovos	777	359	635
ovos viáveis	655	305	489
ovos inviáveis	122	54	146
larvas eclodidas	577	282	446
sobrevivência pós sete dias	563	278	442

Fonte: Autoria própria.

Legenda: Rec – após recuperação biológica.

A taxa de ovos viáveis passou de 0 a mais de 80% para a reprodução realizada após período de recuperação biológica do Índigo Blue e de 10% a 76% para a reprodução após recuperação biológica do Índigo Natural, como visto na réplica R2 IN (Tabela 4). As taxas de eclosão e sobrevivência das larvas foram superiores a 80% em todas as réplicas para ambas as recuperações dos corantes deste estudo (Tabela 4).

Tabela 4 - Taxa por réplica de ovos, eclosão e sobrevivência de larvas após exposição aos contaminantes.

Pós recuperação biológica	Controle		Índigo Blue		Índigo Natural	
Réplica	R1 Cr	R2 Cr	R1 IBr	R2 IBr	R1 INr	R2 INr
ovos viáveis	74%	93%	84%	86%	76%	78%
eclosão considerando número de ovos viáveis	83%	92%	92%	92%	98%	85%
sobrevivência de larvas	98%	97%	97%	100%	99%	100%

Fonte: Autoria própria.

Legenda: R1 - Réplica 1, R2 - Réplica 2, Cr – Controle da recuperação biológica, IBr – recuperação biológica do Índigo Blue, IN – Recuperação biológica do Índigo Natural.

Diante dos resultados foi aplicada a análise estatística Qui-quadrado para avaliação de condições que assegurassem a diferença significativa nos resultados do controle e dos contaminantes previamente observadas para as tabelas de dados brutos e de taxas. Foram organizados os valores de p e qui-quadrado obtidos na Tabela 5. Sendo a relação I a que compara os resultados após primeiro período de 21 dias entre controle, exposição ao Índigo

Blue e exposição ao Índigo Natural; a relação II as análises feitas após o período de recuperação biológica; a relação III comparando os controles antes e após o período de recuperação biológica, os expostos ao Índigo Blue e após recuperação do mesmo e os expostos ao Índigo Natural e após recuperação do mesmo.

Tabela 5 - Análise estatística dos resultados das reproduções.

Relação	Dados para tabela de contingência	Teste qui-quadrado	
		valor de p	valor de χ^2
I	ovos viáveis/ovos inviáveis	<0,0001	367,531
	ovos eclodidos/ovos não eclodidos	<0,0001	277,278
II	ovos viáveis/ovos inviáveis	0,0004	15,47
	ovos eclodidos/ovos não eclodidos	0,0149	8,413
III	ovos viáveis/ovos inviáveis - Controle I e II	0,9848	0,009
	ovos viáveis/ovos inviáveis - Índigo Blue I e II	<0,0001	162,7
	ovos viáveis/ovos inviáveis - Índigo Natural I e II	<0,0001	204,059

Fonte: Autoria própria.

Legenda: I – relação entre os resultados após primeiro período de 21 dias entre controle, exposição ao Índigo Blue e exposição ao Índigo Natural; II – relação entre os dados após o período de recuperação biológica; III – relação comparando o controle antes e após recuperação biológica, entre os expostos ao Índigo Blue e após recuperação e entre os expostos ao Índigo Natural e após recuperação.

Utilizando tabelas de contingência com o programa estatístico Bioestat obteve-se para a relação I, $p < 0,0001$ dos aspectos avaliados demonstrando significância dos resultados obtidos entre o controle e os contaminantes.

Para a relação II, após o período de recuperação biológica quando confrontados os mesmos aspectos, ainda apresentam significância estatística, demonstrando que mesmo com o aumento da taxa de ovos viáveis e aumento da taxa de eclosão sinais de potencial para recuperação biológica, quando comparando as Tabelas 2 e 4 os organismos que haviam sido expostos aos contaminantes não se recuperaram totalmente a ponto de equiparar-se a situação controle.

Na relação III, conforme esperado, os controles antes e após recuperação biológica não apresentaram diferença significativa, sendo o valor de $p > 0,05$. Mas quando comparando os resultados obtidos entre os expostos aos contaminantes houve diferença significativa o que indica que ocorreu recuperação, mesmo a relação II na Tabela 5 apontando que a recuperação ainda não equipare-se ao controle..

Do testes realizado com ovos obtidos e postos em condição de controle e logo após postura (período inferior a duas horas dada a desova) expostos aos contaminantes foi avaliada a taxa de eclosão nas primeiras 72hs. Na Tabela 6 são apresentados o número de ovos que eclodiram, considerando N=5 ovos.

Tabela 6 - Resultados do tester com embriões expostos aos contaminantes.

Réplica	R1	R2	R3	R4
Controle	2	2	4	2
Índigo Blue	1	3	4	2
Índigo Natural	2	3	4	3

Fonte: Autoria própria.

Legenda: R1 – Réplica 1; R2 – Réplica 2; R3 – Réplica 3; R4 – Réplica 4.

Aplicando-se o teste de Kruskal Wallis avalia-se que não houve diferença significativa entre a eclosão de ovos expostos aos contaminantes e o controle ($p=0,0798$).

Do teste com larvas obtidas e eclodidas em situação sem contaminante e depois expostas aos contaminantes ainda nas primeira 24 horas de vida, seguem os resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados teste r com larvas expostas aos contaminantes.

Réplica	R1	R2	R3	R4
Controle	10	9	9	10
Índigo Blue	8	8	9	9
Índigo Natural	8	10	10	10

Fonte: Autoria própria.

Legenda: R1 – Réplica 1; R2 – Réplica 2; R3 – Réplica 3; R4 – Réplica 4.

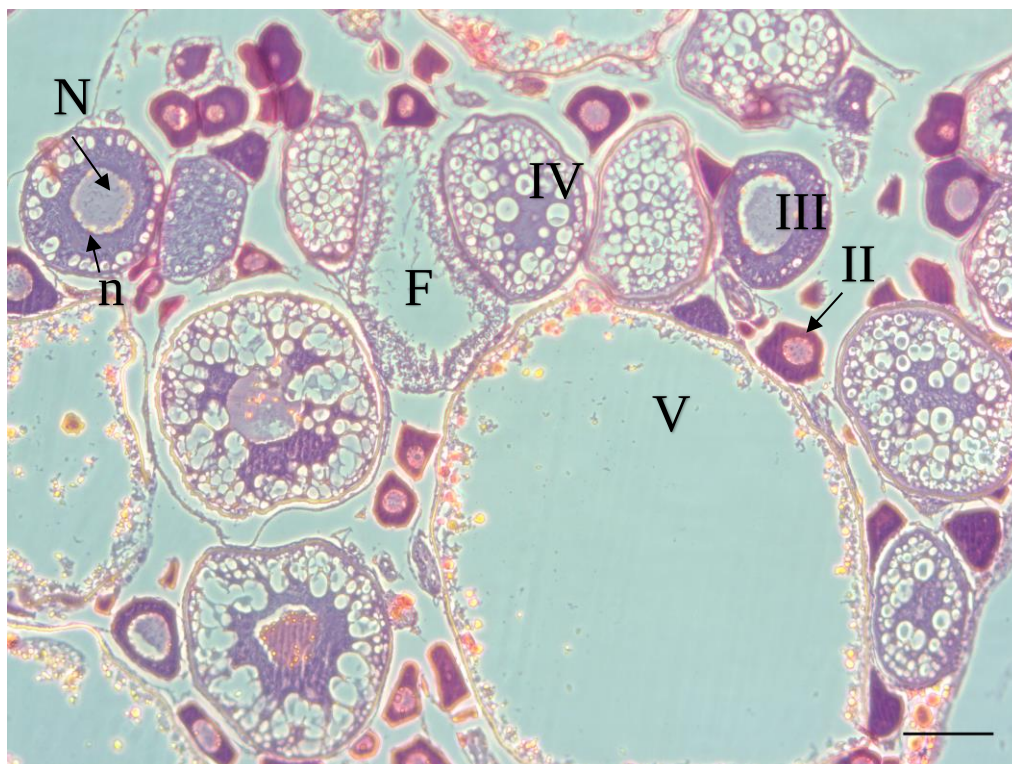
Após eclosão, as larvas expostas aos corantes mantiveram sobrevivência de 7 dias sem apresentar diferença significativa após aplicação do Teste de Kruskal Wallis ($p=0,9986$).

3.2 - Histologia de gônadas

As análises histológicas de gônadas das fêmeas dos controles (após 21 dias e após 42 dias, Figuras 4 e 7 respectivamente) das duas etapas do experimento crônico (antes e após recuperação biológica) com os organismos adultos revelaram padrão normal de distribuição e maturação gonadal, mostrando células em diferentes fases de desenvolvimento de acordo com OECD (2010) e ovários em diferentes estádios de maturação gonadal, fornecendo condições ideais para o desenvolvimento assíncrono de ovócitos, permitindo a desova contínua

conforme a maturação das células germinativas. Na Figura 4, é possível observar diferentes fases de desenvolvimento ovocitário, I (ovogônias); II (oócitos estoques de reserva), III (oócito com vitelogênese lipídica) nessa fase podemos ver o núcleo e nucléolo mais evidentes, IV (oócito com vitelogênese lipídica e protéica), V (vitelogênese completa) e também é possível ver o folículo pós-ovulatório característico pelo seu aspecto disforme.

Figura 4 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *Danio rerio* do grupo de controle após teste crônico de 21 dias.

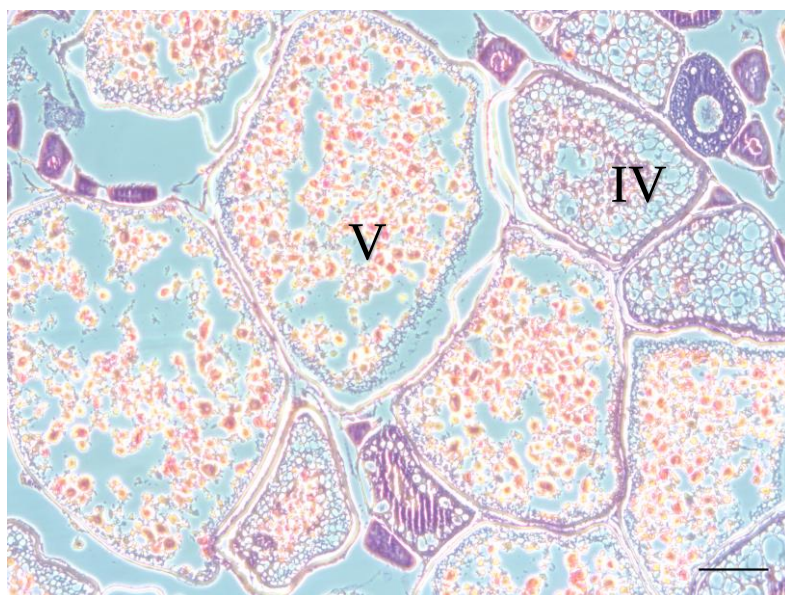


Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: Ovário apresentando oócito em diferentes fases de desenvolvimento: II- oócitos estoques de reserva (Fase II), III – oócito com vitelogênese lipídica (fase III), IV - oócito com vitelogênese lipídica e protéica (fase IV), V -vitelogênese completa (fase V), F – Folículo pós-ovulatório, N – núcleo, n - nucléolo. Escala: 100 µm.

As fêmeas expostas cronicamente a 100 mg/L do corante sintético Índigo Blue e do corante Índigo Natural, separadamente, sofreram alteração no padrão de maturação gonadal. Para os organismos expostos ao corante Índigo Blue (Figura 5), observa-se o predomínio de estágios finais de maturação, oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV) e oócito com vitelogênese completa (Fase V). Para os organismos expostos ao corante Índigo Natural, também foi observado predomínio dos estágios finais de maturação (Figura 6).

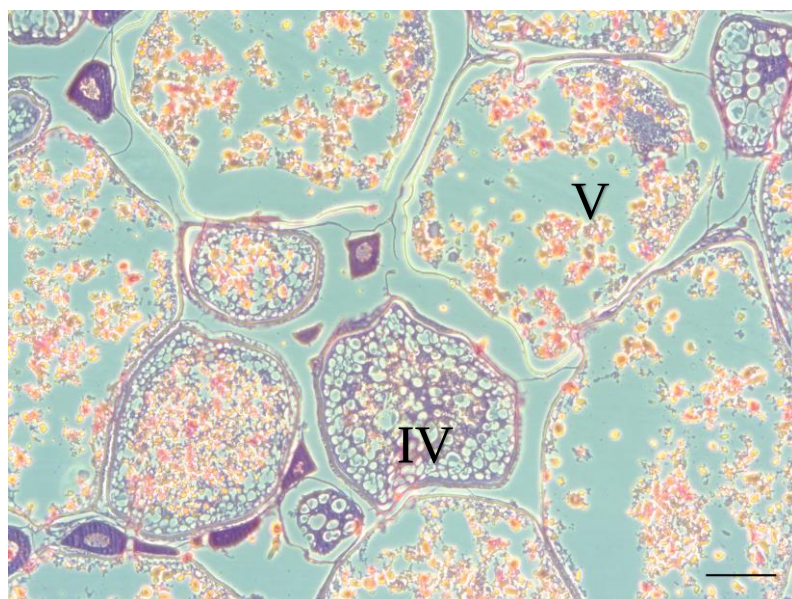
Figura 5 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L do corante sintético Índigo Blue.



Fonte: Acervo pessoal.

Legenda: Ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário com predomínio de fases avançadas de maturação IV e V. Escala: 100 µm.

Figura 6 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L do corante Índigo Natural obtido da planta *Indigofera tinctoria*.

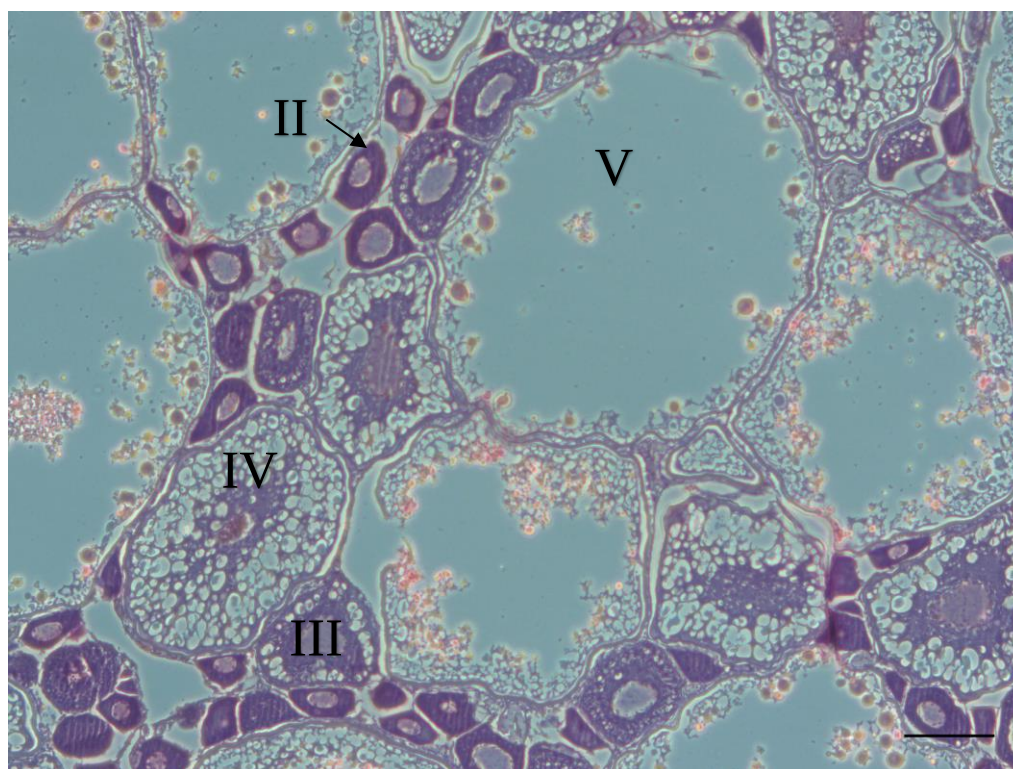


Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: Ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário com predomínio de fases avançadas de maturação IV e V. Escala: 100 µm.

A Figura 7 mostra que o controle mostrou os mesmos padrões após 42 dias de experimento conforme esperado.

Figura 7 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *D. rerio* do controle após teste para avaliação da recuperação biológica totalizando 42 dias em água de cultivo não contaminada.

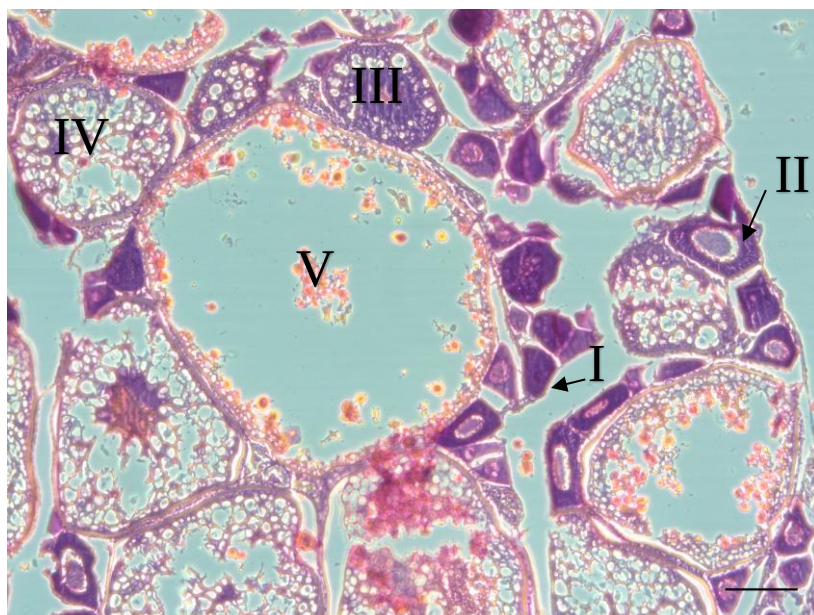


Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: Ovário apresentando oócito em diferentes fases de desenvolvimento: II- oócitos estoques de reserva (Fase II), III – oócito com vitelogênese lipídica (fase III), IV - oócito com vitelogênese lipídica e protéica (fase IV), V -vitelogênese completa (fase V). Escala: 100 µm.

As fêmeas expostas por 21 dias ao corante Índigo Blue e também as expostas ao corante Índigo Natural que seguiram para um período de recuperação biológica (21 dias em água limpa) apresentaram sinal de recuperação biológica pelo aumento de fases intermediárias. Aproximando a um padrão de distribuição e maturação gonodal com diferentes fases de desenvolvimento normal mas não a ponto de se equiparar-se qualitativamente ao controle, conforme pode ser observado nas figuras 8 e 9.

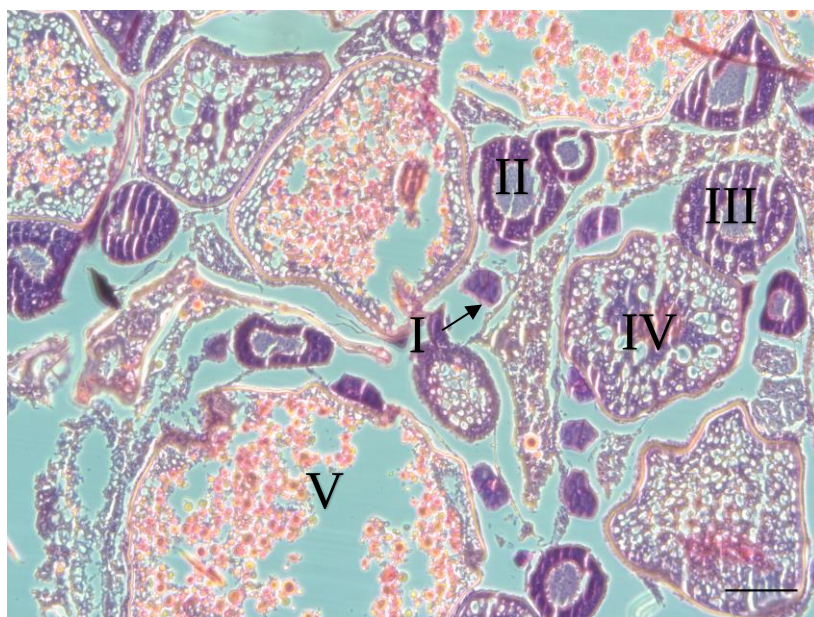
Figura 8 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L do corante sintético Índigo Blue mais 21 dias em água de cultivo não contaminada para avaliação da recuperação biológica.



Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: Ovário apresentando oócito em diferentes fases de desenvolvimento I - ovogônia (células germinativas – fase I); II- oócitos estoques de reserva (Fase II), III – oócito com vitelogênese lipídica (fase III), IV - oócito com vitelogênese lipídica e protéica (fase IV), V -vitelogênese completa (fase V). Escala: 100 µm.

Figura 9 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L do corante Índigo Natural obtido da planta *Indigofera tinctoria* mais 21 dias em água de cultivo não contaminada para avaliação da recuperação biológica.



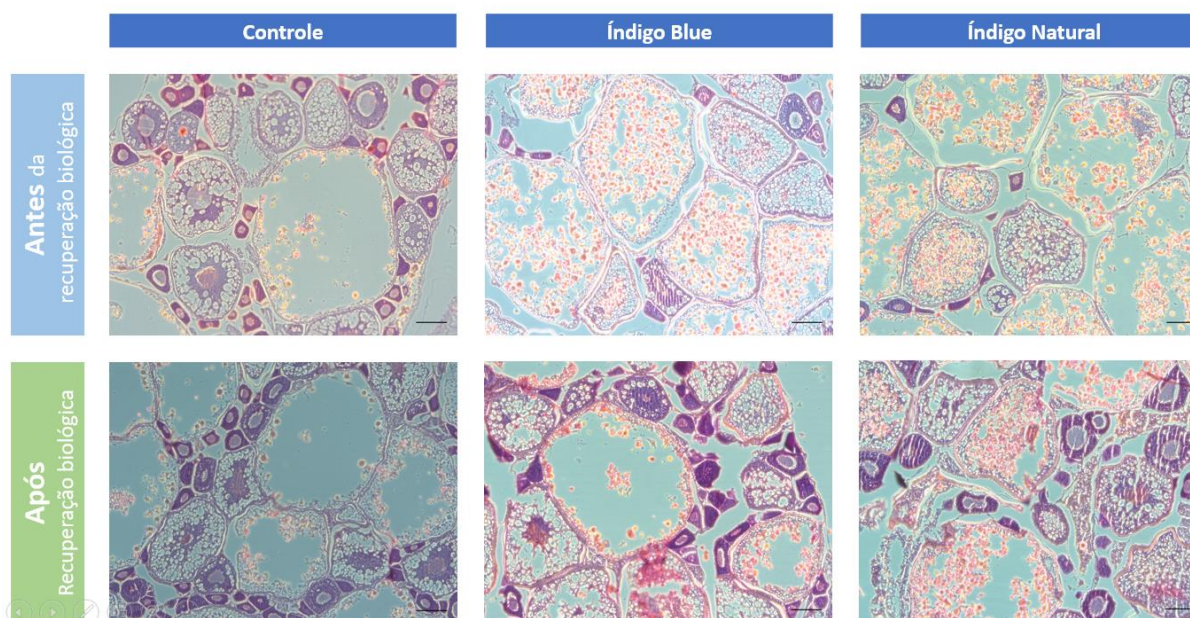
Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: : Ovário apresentando oócito em diferentes fases de desenvolvimento I - ovogônia (células germinativas – fase I); II- oócitos estoques de reserva (Fase II), III – oócito com vitelogênese lipídica (fase III), IV - oócito com vitelogênese lipídica e protéica (fase IV), V -vitelogênese completa (fase V). Escala: 100 μ m.

Segundo os critérios de avaliação da OECD (2010) para avaliação de gônadas expostos na Tabela 8, foram observadas mudanças no estadiamento gonadal, mesmo critério do diagnóstico primário, tanto para as fêmeas expostas ao corante sintético (Índigo Blue) como ao natural (Índigo Natural), mudanças no estadiamento gonadal.

Os resultados das análises histológicas de gônadas de fêmeas também podem ser visualizados nas pranchas comparativas apresentadas nas Figuras 10 (escala: 100 μ m) e 11 (escala: 50 μ m)

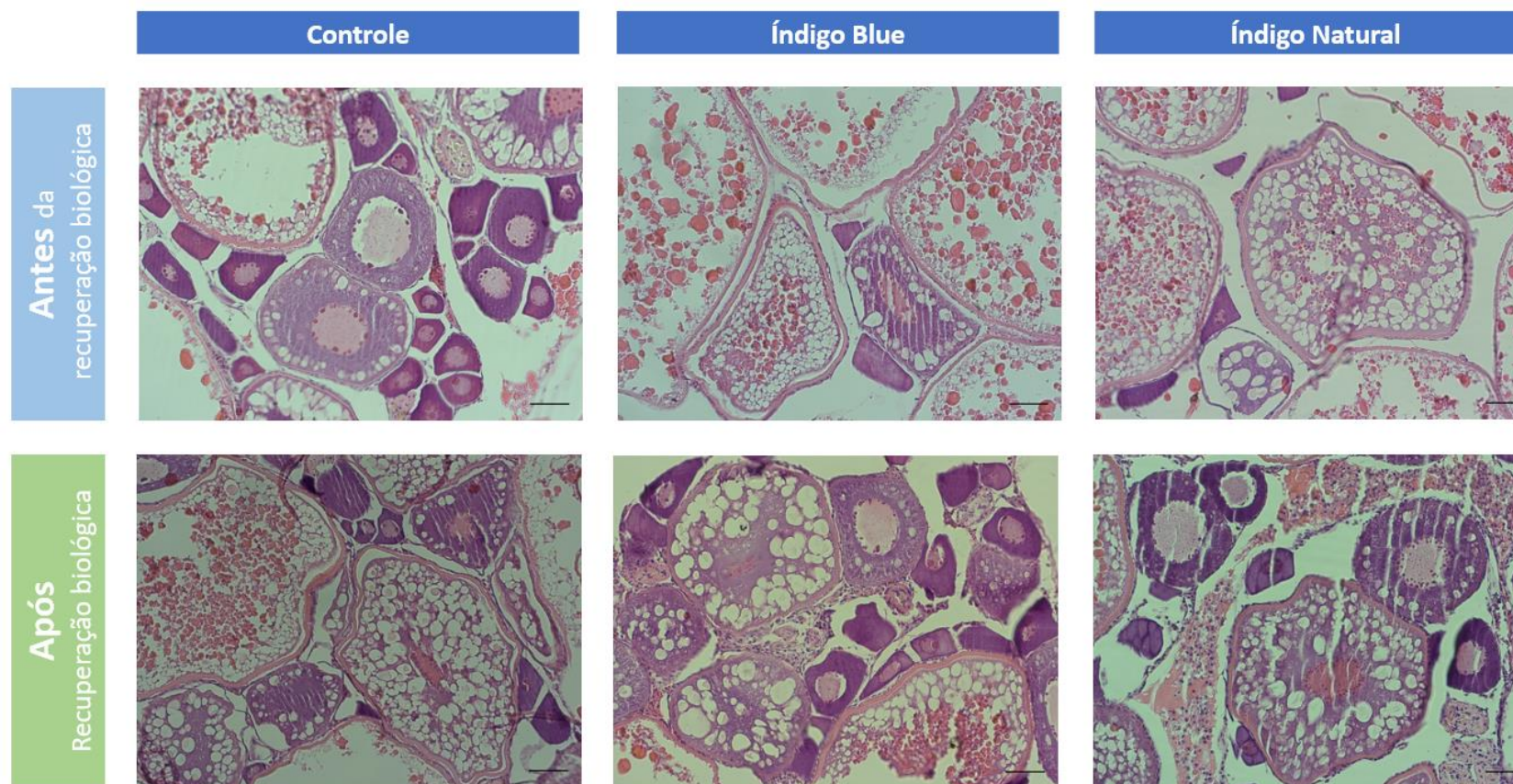
Figura 10 - Prancha I comparativa de gônadas das fêmeas de *D. rerio*.



Fonte: Acervo Pessoal.

Escala: 100 μ m.

Figura 11 - Prancha II comparativa de gônadas das fêmeas de *D. rerio*..

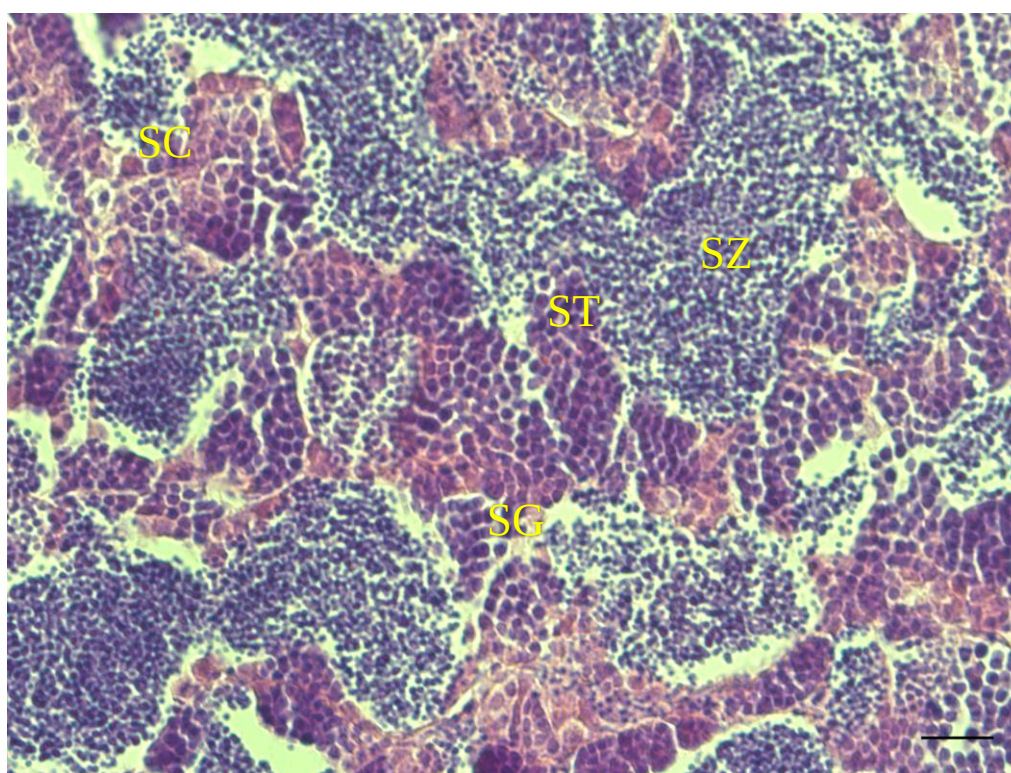


Fonte: Acervo Pessoal.

Escala: 50 μ m.

As análises histológicas de gônadas de machos dos controles das duas etapas do experimento crônico com os organismos adultos revelaram padrão normal de desenvolvimento (Figuras 12 e 15). Sem alterações apresentando todas as fases das células germinativas, espermatogônia (fase inicial de diferenciação), espermatócito, espermatíde e a fase final (desenvolvimento completo), que é o espermatozoide.

Figura 12 – Corte histológico de macho adulto de *D. rerio* do grupo controle após teste crônico de 21 dias.

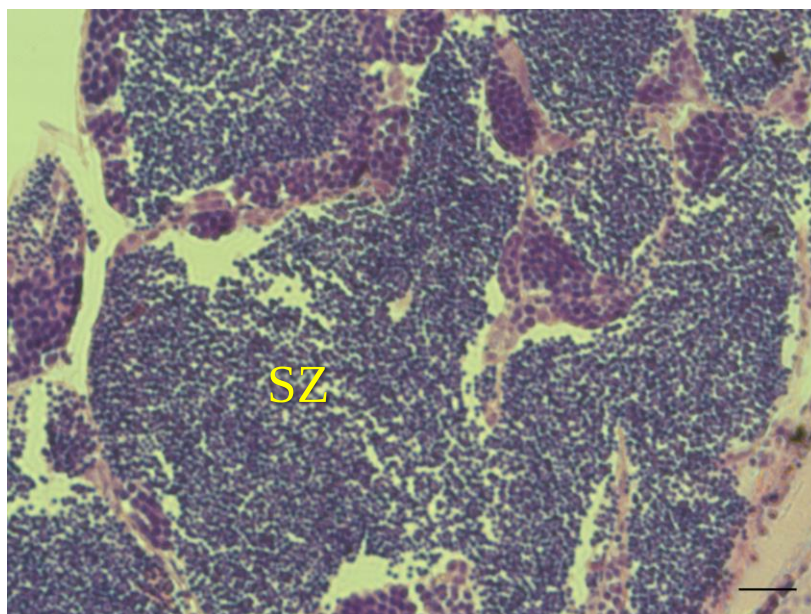


Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: SG – Espermatogônia; SC – espermatócito; ST- Espermatíde; SZ – Espermatozoide. Escala: 20 µm.

A Figura 13 revela predomínio de estágios avançados de maturação gonadal masculina (espermatozoides) para machos expostos ao corante sintético, Índigo Blue. A Figura 14 revela padrão de desenvolvimento gonadal normal para os machos expostos ao corante Índigo Natural.

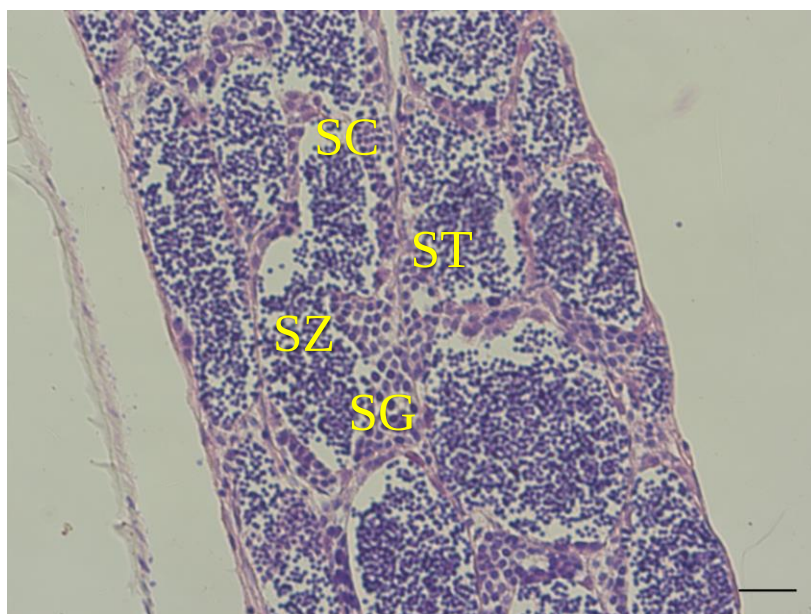
Figura 13 – Corte histológico de macho adulto de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L de corante sintético Índigo Blue.



Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: ST- Espermatozoide. Escala: 20 µm.

Figura 14 – Corte histológico de macho adulto de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L do corante Índigo Natural obtido da planta *Indigofera tintctoria*.

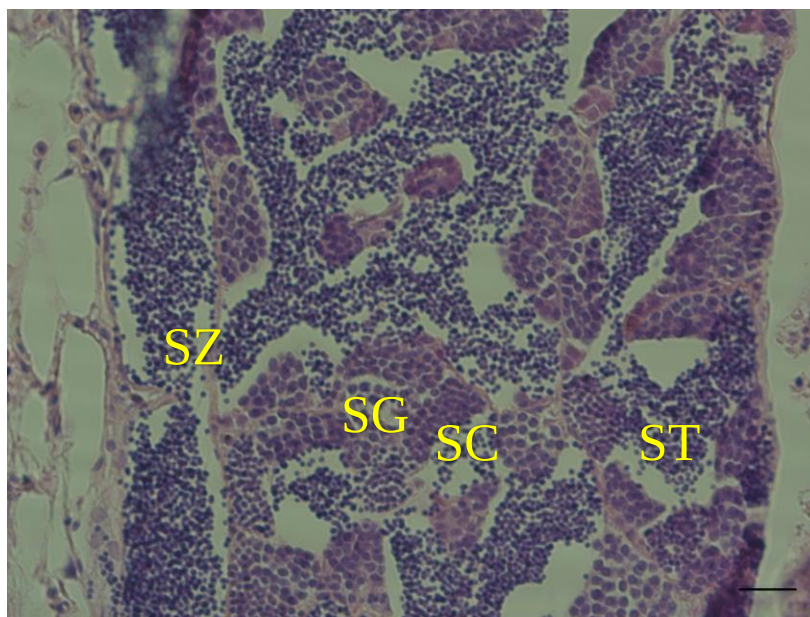


Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: SG – Espermatogônia; SC – espermatócito; ST- Espermátide; SZ – Espermatozoide. Escala: 20 µm.

A figura 15, a seguir, mostra gônada masculina do controle após 42 dias de experimento, mantendo o padrão normal de desenvolvimento gonadal de machos.

Figura 15 - Corte histológico de gônada de macho adulto de *D. rerio* do controle após teste para avaliação da recuperação biológica totalizando 42 dias em água de cultivo não contaminada.



Fonte: Acervo Pessoal.

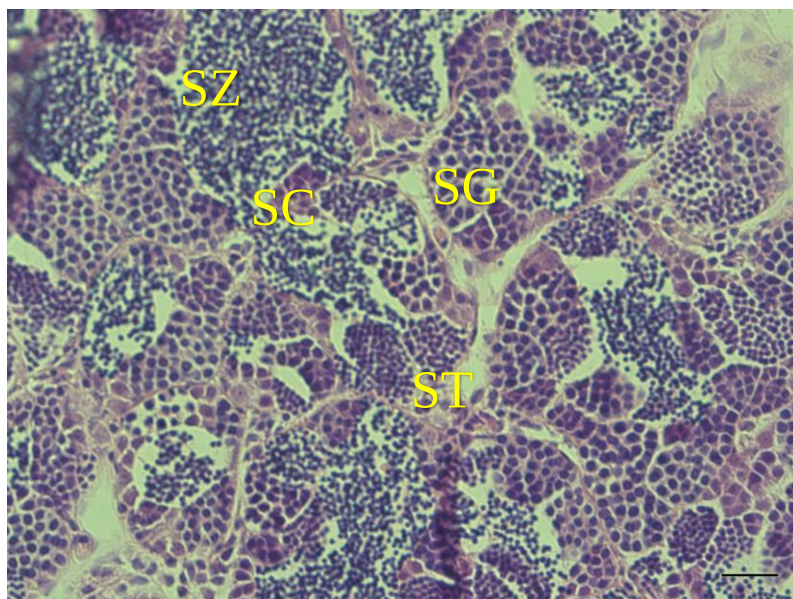
Legenda: SG – Espermatogônia; SC – espermatócito; ST- Espermatíde; SZ - Espermatozoide; Escala: 20 µm.

A Figura 16 revela o potencial da gônada, de macho anteriormente exposto ao corante sintético, recuperar seu desenvolvimento não apresentando predomínio de espermatozoides, é possível observar a presença dos demais estágios de desenvolvimento gonadal.

A Figura 17 mostra padrão normal de desenvolvimento gonadal para machos que anteriormente haviam sido expostos ao corante Índigo Natural e posteriormente permaneceram por vinte um dias apenas em água de cultivo não contaminada.

Segundo os critérios de avaliação da OECD (2010) para avaliação de gônadas foram observados dois diagnósticos para os machos expostos ao corante sintético (Índigo Blue): Alterada proporção de espermatozoides ou espermatócitos e Diminuição da proporção de espermatogônias. Nenhuma alteração observada nos machos expostos ao corante natural (Índigo Natural).

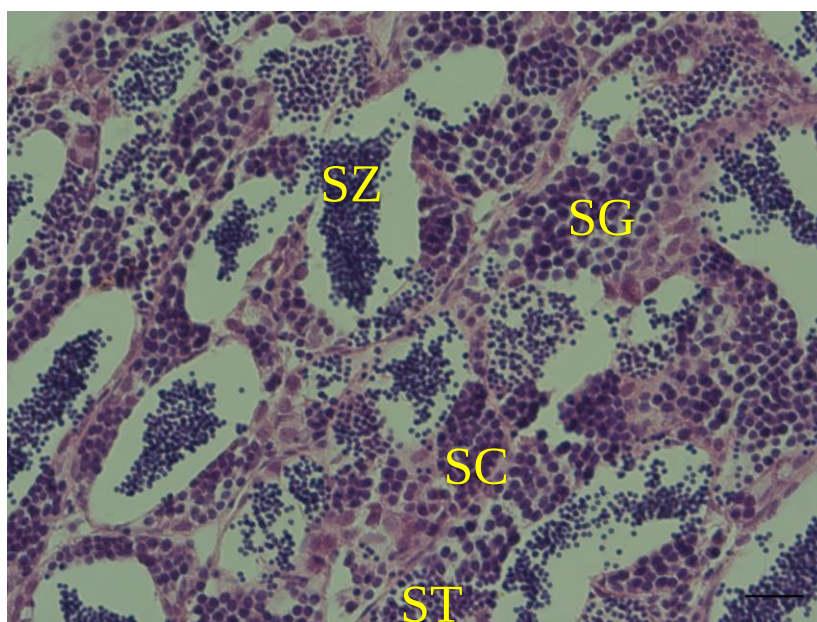
Figura 16 - Corte histológico de gônada de macho adulto de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L do corante sintético Índigo Blue mais 21 dias em água de cultivo não contaminada para avaliação da recuperação biológica.



Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: SG – Espermatogônia; SC – epermátocito; ST- Espermatíde; SZ - Espermatozoide. Escala: 20 µm.

Figura 17 - Corte histológico de gônada de macho adulto de *D. rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 100mg/L do corante Índigo Natural obtido da planta *Indigofera tinctoria* mais 21 dias em água de cultivo não contaminada para avaliação da recuperação biológica.

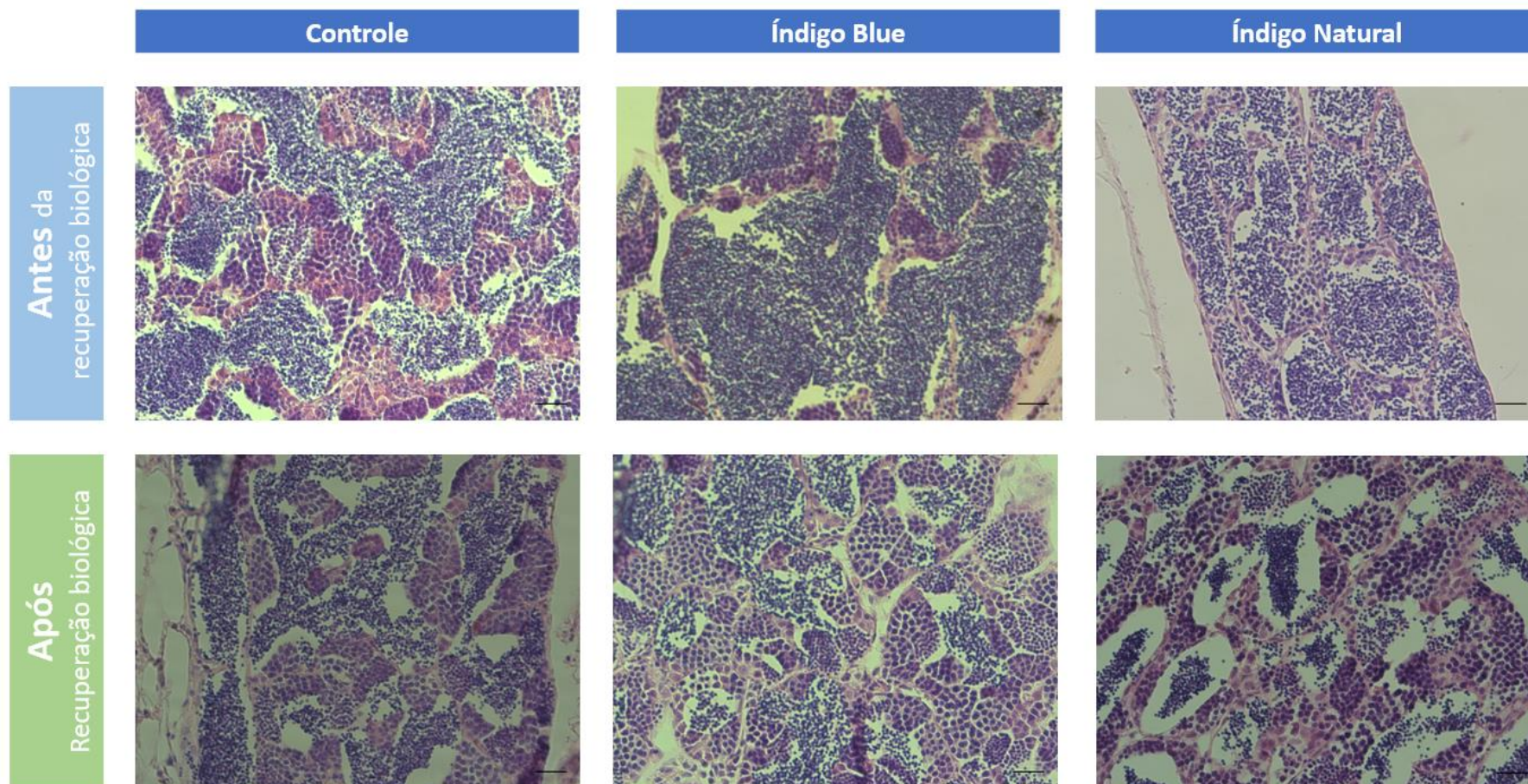


Fonte: Acervo Pessoal.

Legenda: SG – Espermatogônia; SC – epermátocito; ST- Espermatíde; SZ - Espermatozoide. Escala: 20 µm.

As análises histológicas de gônadas de machos também podem ser vistas na prancha comparativas apresentada na Figura 18.

Figura 18 – Prancha comparativa das gônadas de machos de *D. rerio*



Fonte: Acervo pessoal.

Escala: 20 μ m.

4 - DISCUSSÃO

Para o Índigo Blue, informações sobre ecotoxicidade foram encontradas apenas na ficha de segurança da SIGMA ALDRICH (2014), na qual para algas da espécie *Desmodesmus subspicatus* o valor de referência para inibição de crescimento é a CE50, 72h de 100 mg/L. Dessa maneira, o valor selecionado citado por Albuquerque (2009) como a concentração na qual o corante índigo é usualmente encontrado em efluente já é referência de efeito para uma dada espécie. Informações sobre a exposição de organismos aquáticos ao corante Índigo Natural, obtido da planta *Indigofera tinctoria* não foram encontrados. No capítulo 2 deste trabalho foi constatado que quando em contato com outra alga, a *R. subcapitata* não houve diferenças estatísticas no que diz respeito ao crescimento das algas expostas a ambos os corantes na concentração de 100mg/L.

Na ausência de dados histológicos de exposição de *D. rerio* a corantes foi ampliada a busca para encontrar outra espécie de peixe exposta a corantes. Apenas uma pesquisa com peixes, “Tilápia do Rio Nilo”, abordando análise histológica após exposição crônica a corante foi encontrada. Vyavahare et al. (2019) após expor a “Tilápia do Rio Nilo” ao corante crystal violeta analisou as brânquias dos peixes, as quais apresentaram aumento da vaculolização intracelular enquanto os peixes do controle exibiam arquitetura normal de brânquia. O mesmo autor avançou no seu estudo e realizou o tratamento do corante cristal violeta com biocarvão feito do resíduo agrícola, folhas de manga, e expôs os organismos ao resíduo do tratamento, os resultados histológicos apresentaram arquitetura normal das brânquias dos peixes revelando o sucesso do tratamento e a importância da realização de teste ecotoxicológico antes e após tratamentos. Este estudo pioneiro de histologia relacionada a exposição crônica de peixes ao corante crystal violeta mostra o potencial que corantes podem representar em concentrações não letais à fauna aquática (VYAVAHARE et al., 2019). O corante Índigo Blue, apesar de não provocar efeito agudo no teste preliminar de 96hs o qual as concentrações foram elevadas até 1,6g/L demonstrou pelos resultados de reprodução e histologia que cronicamente a concentração de 100mg/L acarreta implicações que podem afetar mecanismos de sobrevivência da espécie.

Com o organismo *D. rerio* foi encontrada apenas três pesquisas relacionadas ao estudo de corantes. Abe et al. (2017) realizaram teste com embriões expondo-os ao corante sintético (BR51) e ao corante natural obtido de fungos (ERY), ambos vermelhos, e utilizou-se de respostas morfológicas e comportamentais mostrando que o *D. rerio* é um modelo animal

relevante para avaliar os efeitos sub-letais em caso de exposição a estes contaminantes. Segundo Abe et al. (2017) o teste FET (Fish Embryo Test) apontou malformações do saco vitelino induzidas por ERY e BR51, enquanto o ensaio comportamental detectou prejuízo locomotor na natação das larvas. Neste mesmo estudo identificou-se que o ERY pode ser facilmente fotodegradado em um composto que não induza nenhum efeito adverso no início da vida do *D. rerio* nas condições testadas, enquanto o BR51 não se degrada após exposição à luz, sugerindo um bom potencial de ERY, o corante natural obtido de fungo, para aplicação posterior como eco corante amigo das indústrias (ABE et al., 2017). Segundo Oliveira et al. (2015) os corantes direct black 38, reactive blue 15, reactive orange 16 e vat green 3 induziram malformações durante o desenvolvimento embrionário e larval em *D. rerio*. O terceiro estudo utilizando *D. rerio* foi encontrado para estudo de corante não têxtil, porém capilar, onde embriões indicaram malformações quando estes são expostos à Henna (LIU et al., 2007).

Segundo Alkimin (2016) no caso de metais existe uma escassez de resultados que envolvam a reprodução, em relação aos parâmetros número de ovos e larvas, e que os trabalhos encontrados focavam o estudo do efeito do contaminante diretamente no ovo, como acúmulo, efeito na casca e/ou desenvolvimento e tempo de eclosão, e em larvas, má formação e sobrevivência mas não abordavam a postura de ovos sendo este um padrão reprodutivo importante. No caso de estudos com corantes também observou-se escassez.

Por interferir na penetração de luz afetando diretamente a fauna aquática, os corantes podem representar uma problemática até por questão físicas, por exemplo, o organismo teste do presente trabalho, o *D. rerio* tem no choque de luz pela manhã um estímulo para a desova. Corantes como o índigo, de tonalidade escura, podem interferir nessa luminosidade que é um mecanismo essencial para a desova do organismo deste estudo, outros corantes que impactam a coloração aquática poderiam ser estudados neste aspecto.

Nas diferentes bases de pesquisa como Google Acadêmico, Portal de Periódicos CAPES e Science Direct os estudos mais recentes encontrados, publicados nos últimos cinco anos envolvem estudos de toxicidade utilizando *D. rerio* como organismo para análise de fungicida, hormônio, qualidade de água potável, parâmetros de preocupação com potencial risco de atingir a vida humana. Nos estudos pesquisados observou-se que não há uma metodologia restrita para avaliar parâmetros reprodutivos. Pohl et al. (2018) mostrou que águas residuais com tratamento de ozonização promovem melhores resultados de reprodução do que em efluentes sem ozonização e este estudo explora a expressão gênica, o comportamento e a vitelogenina. Debofsky et al. (2018) se foca nos impactos reprodutivos relacionados a dieta de *D. rerio* causados nas fêmeas, observando ovário além da fecundidade e a mortalidade de

embriões. Os estudos encontrados, portanto para outros poluentes que não corantes também não exploravam a postura de ovos como um endpoint.

A reprodução é essencial para a manutenção da espécie, incorporando um importante parâmetro de avaliação ecotoxicológica, quanto mais aspectos relacionados a reprodução maior a garantia de proteção de espécies aquáticas. Este trabalho teve como primeiros resultados a desova que apresentou diferentes resultados entre o controle e os organismos expostos ao Índigo Blue e ao Índigo Natural. Segundo a norma ABNT NBR 15499 (2015) uma fêmea produz em média 300 ovos durante a desova, cerca de 70 a 90 % são ovos viáveis estas condições foram atingidas pelos controles antes (somando as duas réplicas = 625 ovos, 80% viáveis) e após recuperação biológica (somando as duas réplicas = 777, 74% viáveis) garantindo a validação deste teste. A resposta de desova aos organismos expostos a 100mg/L do corante Índigo Blue (48 somando as duas réplicas, 0% viáveis) e da desova organismos expostos a 100 mg/L do corante Índigo Natural (115 somando as duas réplicas, 10% da réplica 1 apenas) mostram-se bem discripantes do controle, em especial o Índigo Blue o qual nenhum dos ovos se apresentou como viável. Destaca-se que essas reproduções foram realizadas com os organismos expostos as mesmas condições na qual permaneceram por 21 dias. Portanto havia o questionamento, se o impacto na desova podia ter sido acarretado por um fator físico, dada a alteração da cor ou se havia uma alteração provocada nas gônadas dos organismos adultos, dúvida sanada com a ferramenta que a histologia representa podendo analisar os organismos a um nível tecidual.

A falta de ovos viáveis de Índigo Blue e a baixa de ovos viáveis de Índigo Natural não permitiriam a análise da taxa de eclosão de ovos em contaminação (100mg/L de cada corante em cada tratamento) apenas a partir do momento de sua desova. Mas o teste com embrião reproduzido em condições de água limpa (bem como seus genitores) e expostos aos contaminantes logo após sua postura permitiu analisar estatisticamente que a presença de ambos os contaminantes não acarretaram impacto a taxa de eclosão. O mesmo foi observado no teste realizado com larvas recém eclodidas em ambiente descontaminado (bem como ambiente onde estavam seus genitores) quando inseridas a partir das primeiras 24hs pós eclodidas aos contaminantes, ao permanecerem nesta condição por sete dias em contato com 100mg/L dos corantes em estudo análises estatísticas não mostraram significância em relação ao controle. Ressalta-se que não foram avaliados parâmetros subletais nessas fases da vida larval (não foram realizadas análises histológicas de larvas, nem analisado comportamento natatório) nem nos embrionária (não foram avaliados em parâmetros qualitativos tais como batimento cardíaco e presença de somitos entre outros endpoints do FET teste).

As análises histológicas dos organismos adultos trouxeram respostas que refletem os resultados obtidos das desovas. Tanto as fêmeas de *D. rerio* expostas cronicamente por 21 dias a 100 mg/L de Índigo Blue como as expostas a 100mg/L de Índigo Natural terem revelado predomínio de fases finais de maturação é um fator potencial para provocar problemas na perpetuação de *D. rerio*, partindo-se do princípio que chegará um determinado tempo que não haverá oócitos suficientes para amadurecer.

Teng et al. (2017) estuda o efeito de bioacumulação do difenoconazole em *D. rerio* que apresentou-se maior em fêmeas do que em machos, por isso é importante levar os organismos de mesma espécie porém de diferentes sexos as mesmas análises histológicas para ver qual dos sexos pode sofrer maiores impactos expostos ao mesmo contaminante. No presente trabalho, observou-se que as gônadas femininas de Índigo Natural sofreram maior impacto pois para os machos expostos a este corante natural nenhuma alteração foi observada. E para o Índigo Blue não só as fêmeas apresentaram predomínio de fases maduras como os machos expostos a este corante sintético também apresentaram predomínio de fases mais maduras de desenvolvimento gonadal (espermatozóides).

A diminuição 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. Organismos como o *D. rerio* são considerados elo da cadeia alimentar e sua falta pode provocar efeitos nos diferentes níveis tróficos, como por exemplo, ausência de alimento nos níveis superiores e a ausência de predação nos inferiores (ALKIMIN, 2016).

Em relação a recuperação biológica, quando os organismos que haviam sido expostos aos corantes permaneceram por igual tempo expostos apenas a água de cultivo não contaminada, demonstraram potencial de recuperar-se. Essa resposta pode ser observada nos resultados tanto pela desova que os organismos tiveram após o período de recuperação quanto pelas análises histológicas. Mas quando confrontados os mesmos aspectos de ovos viáveis, taxa de eclosão com a condição controle, ainda apresentam significância estatística, demonstrando que mesmo com o aumento da taxa de ovos viáveis e aumento da taxa de eclosão, quando comparando as Tabelas 2 e 4 os organismos que haviam sido expostos aos contaminantes não se recuperaram totalmente a ponto de equiparar-se a uma situação na qual os organismos nunca tiveram contato com os contaminantes. O mesmo é observado qualitativamente na análise histológica das fêmeas que apesar de um aumento de ovogônias e oócitos estoques de reserva presentes na mesma proporção que uma situação controle. Em relação a resposta histológica de machos após o período de recuperação biológica, os que haviam sido expostos anteriormente a Índigo Blue mostraram reversibilidade.

Segundo Luzio et al. (2016) que estudou a recuperação biológica de *D. rerio* após exposição a estrogênio, ressalta que apesar de sinais de recuperação só o estudo com períodos mais longos poderiam concluir se a recuperação total das gônadas ocorre ou não. Seria este o caso de avaliação para as gônadas femininas, há a possibilidade da reversibilidade total em períodos estendidos de recuperação mas este estudo replicou o mesmo tempo de exposição ao contaminante como tempo de estudo para avaliar o potencial da recuperação.

Arini et al. (2015) estudou a recuperação de peixes após exposição ao metal Cádmio, sugerindo uma recuperação quase completa de peixes expostos ao Cádmio que podem refletir uma regulação gênica efetiva do peixe à contaminação residual deste metal. No entanto, esses resultados foram obtidos em caso de remoção completa da contaminação. No caso de uma descontaminação progressiva do meio, o tempo de recuperação seria certamente mais longo destacando-se a importância da variável tempo conforme a retirada do contaminante (ARINI et al., 2015).

Kormaz et al. (2018) avaliou como biomarcadores enzimas de *D. rerio* que expostas por 96 horas a pesticidas tinham sua atividade prejudicada neste estudo os vinte dias destinados a recuperação não foram suficientes para recuperação dos organismos expostos aos pesticidas. Ou seja, dependendo do contaminante mesmo a exposição a curto período a substância em estudo pode demandar um longo período para ocorrer indicadores de recuperação.

Este estudo também demonstrou que estudo de efeitos subletais em organismos aquáticos em resposta a exposição de corantes, seja ele sintético ou natural é um campo bem amplo a ser explorado, constituídos os diferentes corantes usados hoje pela indústria têxtil. Cerca de 10000 corantes diferentes são utilizados nos processos da cadeia têxtil, representando um descarte anual de 200 mil toneladas por ano devido a ineficiência nos processos de tingimento (OGUGBUE & SAWIDIS, 2011; SOUZA & FORGIARINI, 2007).

5 - CONCLUSÃO

Conclui-se que tanto o corante sintético quanto o corante natural provocaram efeitos significativos. Relacionando-se ovos viáveis/ovos inviáveis e ovos eclodidos/ovos totais ambos os corantes apresentaram toxicidade. Quanto as análises histológicas das gônadas de *D. rerio* demonstraram que os ovários das fêmeas tanto expostas ao Índigo Blue como ao Índigo Natural, apresentaram predomínio de fases avançadas de maturação. No caso das gônadas masculinas, os machos expostos ao Índigo Blue apresentaram predominância de espermatozoides. Não foram observadas interferências no desenvolvimento gonadal dos machos expostos ao Índigo Natural, o que sugere que para este sexo o corante natural não representa perigo na concentração estudada.

Os resultados histológicos demonstram que pela resposta verificada na desova que há uma interação entre os contaminantes a um nível celular com os organismos.

As análises demonstraram capacidade de recuperação biológica.

REFERÊNCIAS

ABE F. R.; MENDONÇA, J. N; MORAES, L. A. B.; OLIVEIRA G, A. R.; GRAVATO, A. C.; SOARES A. M. V. M.; OLIVEIRA, D. P. **Chemosphere**, v. 178, p. 282-290, 2017.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088**: ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com peixes. 2. ed. Rio de Janeiro, 2011.

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

ALBUQUERQUE L. F. **Aplicação de água residuária das salinas no tratamento de efluente têxtil**. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais). 170 f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2009.

ALKIMIN G. D. 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, 2016.

ARINI, A.; GOURVES, P. Y.; GONZALEZ, P.; BAUDRIMONT, M. Metal detoxification and gene expression regulation after a Cd and Zn contamination: An experimental study on *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 128, p. 125 – 133, 2015.

AYRES, M. Bio Stat 5.0 Computacional program (2007).

DEBOFSKY, A. R.; KLINGER, R. H.; MORA-ZAMORANO, F. X.; WALZ, M.; SHEPHERD, B; LARSON, J. K.; ANDERSON, D.; YANG, L.; GOETZ, F.; BASU, N.; HEAD, J.; TONELLATO, P.; ARMSTRONG, B. M.; MURPHY, C.; CARVAB M. J. Female reproductive impacts of dietary methylmercury in yellow perch (*Perca flavescens*) and zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**. v.192, p.301-311, 2018.

FATIMA, M.; USMANI, N.; HOSSAIN, M. M. Heavy Metal in Aquatic Ecosystem Emphasizing Effect on Tissue Bioaccumulation and Histopathology: A Review. **J. Environ. Sci. Technol.**, v.7, n.1, p. 1-15, 2014.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Quím. Nova.** v. 23, n. 1, p. 71 – 78., 2000.

HINTON, D. E. Cells, Cellular Responses and their Markers on Chronic Toxicity of Fishes. *Aquatic Toxicology: Molecular Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, p. 207-239, 1994

JOBLING, S.; TYLER, C. R. Introduction: the relevance of chemically induced endocrine disruption in wildlife. **Environ. Health. Perspec.**, v. 114, n. suppl., p. 7-8, 2006.

KLAASSEN, C. D.; CASARETT, L. J.; DOULL, J. Casarett and doulls toxicology: the basic science of poisons. **McGraw-Hill Education**. 8 ed. Nova York, 2013.

KORMAZ, V.; GUNGORDU, A.; OZMEN M. Comparative evaluation of toxicological effects and recovery patterns in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to phosalone-based and cypermethrin-based pesticides. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 160, p. 265-272, 2018.

LIU, H.; YU, H.; GIESY, J. P.; SUN, Y.; WANG, X. Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*). **Chemosphere**, v. 66, n. 11, p. 2159-65, 2007.

LUZIO, A. MONTEIRO, S. M.; ROCHA, E.; FERNANDES, A. A. F.; COIMBRA, A. M. Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (ethinylestradiol and fadrozole). **Aquat. Toxicol.** ,v. 175, p. 90-105, 2016.

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development. **Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads**. Paris: OECD, 2010.

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.; LAPUENTE J.; TEIXIDO E.; PORREDON, C.; BORRAS, M; OLIVEIRA, D. P. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 35, n. 2, p. 429-434, 2015.

OGUGBUE, C. J.; SAWIDIS, T. Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by *Aeromonas hydrophila* isolated from industrial effluent, **Biotechnol. Res. Int.** ,p. 1- 11, 2011.

POHL, J.; BJORLENIUS B.; BRODIN, T.; CARLSSON, G. Effects of ozonated sewage effluent on reproduction behavioral endpoints in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**. v.200, p.93-101, 2018.

SCHOLZ S.; FISHER, S.; GUNDEL, V; EBERHARD, K.; TILL, L.; DORIS, V. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment – Applications beyond acute toxicity testing. **Environ c Pollut Res Int**, v. 15, n. 5, p. 394–404. 2008.

SIGMA ALDRICH. **Safety Data Sheet – Índigo Blue**. 2014. Disponível em:< <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=229296&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F229296%3Flang%3Dpt>>. Acesso em: 15 de Jan. 2018.

SOUZA S. M. A. G. U.I; FORGIARINI E.; SOUZA A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP), **J. Hazard. Mater.**, v.147 p. 1073-1078, 2007.

TENG, M.; SUZHEN, Q; WENTAO, Z.; YAO, W.; DEZHEN, W. Sex-specific effects of difenoconazole on the growth hormone endocrine axis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotox. Environ. Safe**. V.144, p. 402-408. 2017.

VYAVAHARE, G.; JADHAV, P; JADHAV, J; PATIL, R.; AWARE, C.; PATIL, D.: GOPHANE, A.; YANG, Y.; GURAV, R. Strategies for crystal violet dye sorption on biochar derived from mango leaves and evaluation of residual dye toxicity. **J. Clean. Prod.**, v. 207, p. 296-365, 2019.

ZAMORA P.; KUNZ, A.; MORAES, S.G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quím. Nova**,v.25, p. 78 – 82. 2002.

ZANONI, V. B; YAMANAKA, H. (Orgs). **Corantes Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. São Paulo: Editora UNESP, 2016.

APÊNDICE - MEMORIAL FOTOGRÁFICO

Figura 1 - Cultivo de *R. Subcapitata*.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 2 – Disposição aleatório durante os teste com *R. subcapitata*.



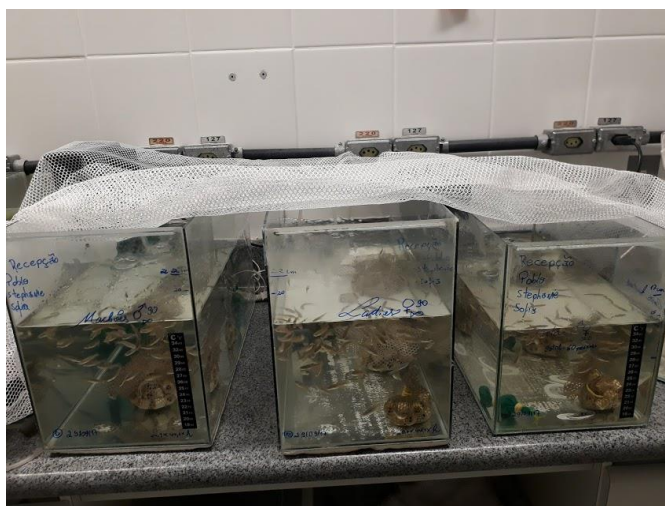
Fonte: Acervo pessoal..

Figura 3 – Tanque preparo de água de cultivo.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 4 - Cultura de *D. rerio* mantida pela mestranda para esta pesquisa.



Fonte: Acervo pessoal..

Figura 5– Réplica 1 do ensaio preliminar (agudo).



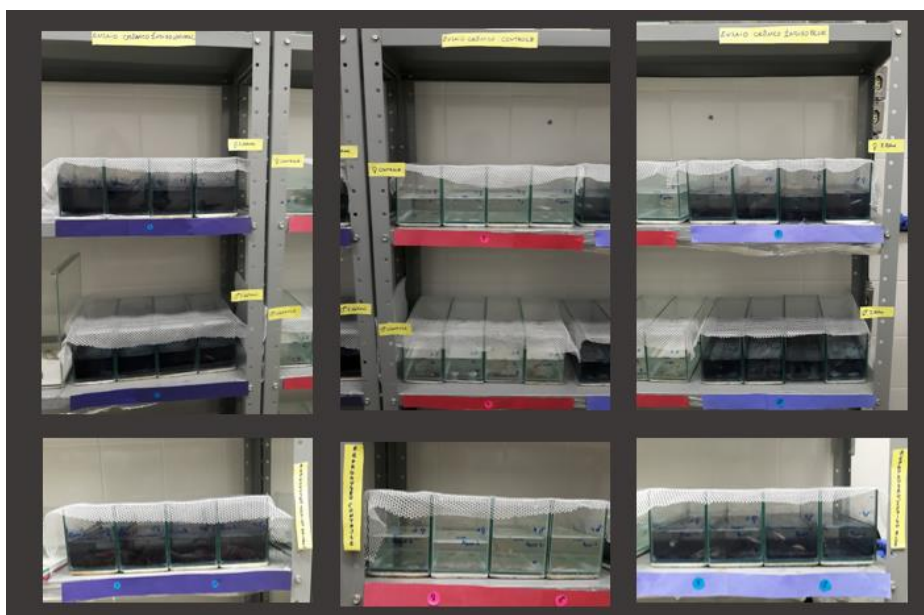
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 6– Disposição dos aquários na sala com fotoperíodo controlado durante o ensaio crônico.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 7 - Disposição - visão frontal dos tratamentos com: Índigo Natural (esquerdo), Controle (centro), Índigo Blue (direito).



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 8 – Aquários montados para o dia da reprodução.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 9 – Cortejo dos dois machos com a fêmea de *D. rerio*.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 10 – Higienização de ovos de *D. rerio*.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 11 – larvas eclodidas de *D. rerio*.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 12 – *D. rerio* após exposição aos contaminantes em período de recuperação biológica.



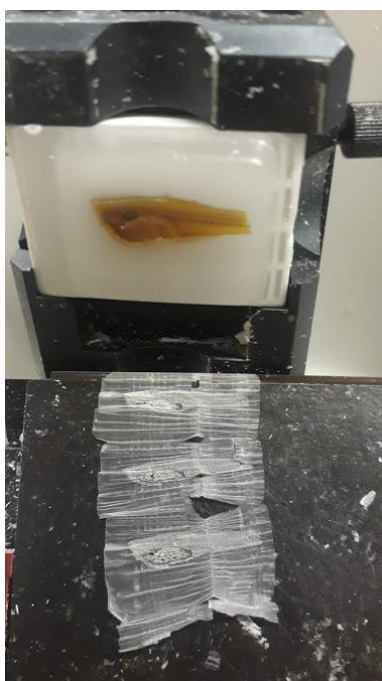
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 13 – Amostras de *D. rerio* posicionados em cassetes plásticos para processamento histológico



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 14 – Bloco contendo material histológico e *D. rerio* em detalhe para o corte em micrótomo



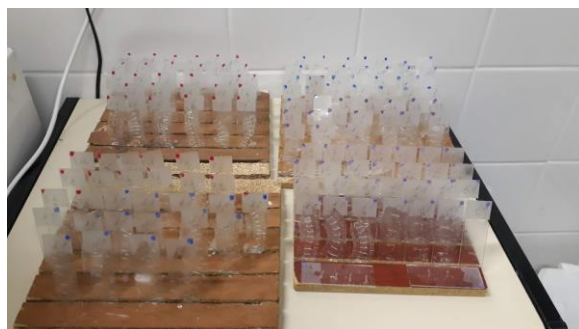
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 15 – Recipiente com as fitas de parafina contendo os cortes histológicos de amostra de *D. rerio* para a coleta e posicionamento em lâmina de vidro.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 16 – Lâminas histológicas com amostras de tecido do *D. rerio*



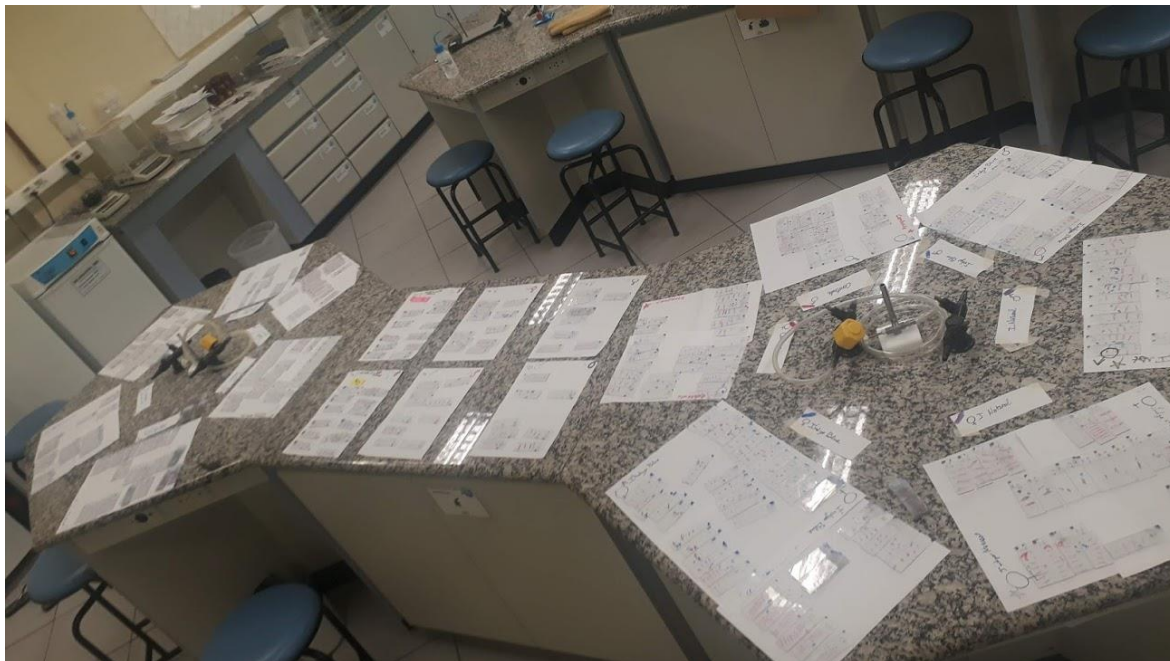
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 17 – Cubetas de bateria de coloração com hematoxilina e eosina das lâminas histológicas com amostras de *D. rerio*.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 18 – Lâminas histológicas prontas em análise com microscópio.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 19 – Mestranda realizando análises histológicas em microscópio de luz.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 20 – Teste com embriões de *D. rerio* expostos aos tratamentos após postura.



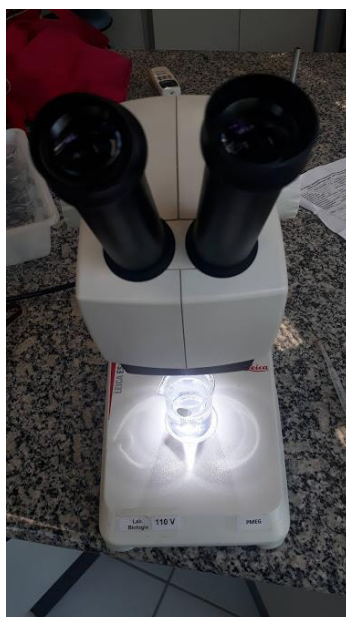
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 21 – Embriões de *D. rerio* do controle.



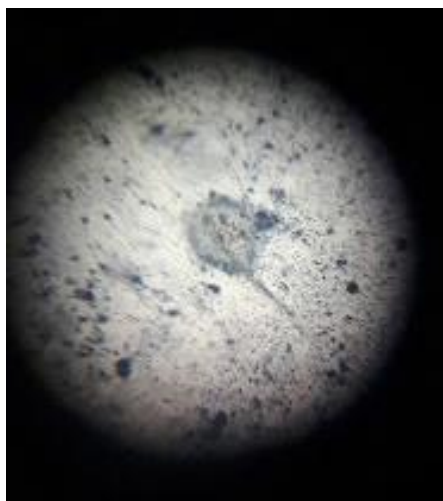
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 22 – Lupa para facilitar visualização de embriões e larvas de *D. rerio*.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 23 – Larva eclodindo no ambiente contaminado com corante



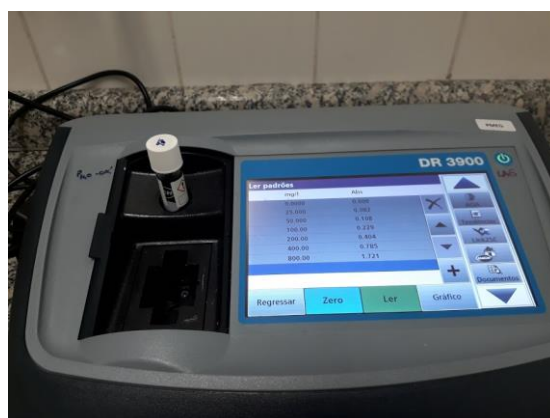
Fonte: Acervo pessoal.

Figura 24 – Balões utilizados para fazer curva de calibração



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 25 – Espectrofotômetro utilizado para fazer as leituras do estudo de degradação



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 26 – Mestranda aprendendo a tingir com o corante natural durante o primeiro “Brasil Eco Fashion Week” realizado em novembro de 2017 na cidade São Paulo – SP.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 27 - Simpósio Zebrafish



Fonte: Acervo pessoal.