



Aspectos ecotoxicológicos dos corantes índigo blue sintético e natural: ênfase para o biomarcador histológico (tecido nervoso) de *Danio Rerio* antes e após recuperação biológica.

Pablo Ferreira¹
Renata Fracácio Francisco²

Recursos Hídricos e Qualidade da Água

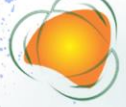
Resumo

Na atual sociedade, observa-se a exacerbada poluição dos ambientes aquáticos provenientes de produtos químicos que ameaçam a biota e o equilíbrio desse meio. Nesse contexto, destacam-se os setores têxtil e alimentício, que por meio de seus efluentes líquidos, lançam corantes, dentre outros agentes poluidores de alto grau de complexidade química, de difícil degradação e elevado potencial de interagir com os sistemas biológicos. Dentre os corantes, destaca-se o índigo blue na fabricação de jeans amplamente utilizado no mundo. Nesse sentido, foi objetivo do presente estudo avaliar o potencial ecotoxicológico dos corantes índigo blue sintético e natural, na concentração de 100 mg. L⁻¹ por meio da exposição crônica (21 dias) do organismo-teste *Danio rerio*, seguindo-se a análise do biomarcador histológico, tecido nervoso. Após período de exposição, uma porcentagem dos organismos-teste expostos aos corantes permanece por mais 21 dias em água de cultivo a fim de avaliar-se a recuperação biológica, analisando-se o mesmo biomarcador acima citado. Foram observadas múltiplas alterações em ambas as situações experimentais, sendo que as mais frequentes consistiram na degeneração do tecido nervoso, vacuolizações e células picnóticas, evidências de morte celular precoce, comprovando a ecotoxicidade desses corantes em meio aquático. Destaca-se ainda que em experimentos de recuperação biológica de 21 dias, não houve reversão das lesões desencadeadas no tecido nervoso, pela exposição aos corantes índigo blue sintético e índigo blue natural, indicando a severidade dos efeitos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Índigo Blue; Zebrafish; Histopatologia; Tecido Nervoso.

¹Aluno (s) do Curso (graduação em Engenharia Ambiental), UNESP Sorocaba – Instituto De Ciência e Tecnologia de Sorocaba (ICTS) / Laboratório de Toxicologia e Histologia (LATHIS).
pablo.ferreira@unesp.br.

²Profª. Associada UNESP Sorocaba – Instituto De Ciência e Tecnologia de Sorocaba (ICTS) / Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histopatologias (LATHIS).
renata.fracacio@unesp.br.



INTRODUÇÃO

A poluição de corpos hídricos é uma das maiores problemáticas ambientais da atualidade. Os efluentes industriais, originários dos mais diversificados processos de produção, têm sido historicamente um importante fator de degradação ambiental. Nesse processo, destacam-se os poluentes inorgânicos, como os metais potencialmente tóxicos, e os orgânicos, que além de apresentar uma diversidade de sítios de ligação com os sistemas biológicos, ainda podem gerar subprodutos com maior potencial ecotoxicológico. (ARCHELA et al, 2003). Nesse contexto, compostos químicos muito utilizados em uma ampla diversidade de indústrias são os corantes sintéticos, com diversas finalidades como, por exemplo, tornar os produtos esteticamente diferenciados, como na produção têxtil, tornar alimentos mais chamativos, além do uso na produção de couro, cosméticos, papel, automobilístico, dentre outros.

A literatura relata que do total de corantes produzidos, dois terços destinam-se à indústria têxtil, e são utilizados em larga escala. (DA SILVA et al., 2021). Estima-se que 2.000 tipos de corantes estão atualmente disponíveis devido a variedade de fibras existentes que precisam ser coloridas de acordo com suas especificidades (ALMEIDA et al., 2004; GUARATINI; ZANONI, 2000). A indústria têxtil é uma atividade que faz uso de grande volume de água, e dentre os corantes mais utilizados mundialmente, estão os indigóides, na fabricação de Jeans (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Diante do exposto, a presente pesquisa buscou estudar os aspectos ecotoxicológicos do corante índigo blue sintético e natural, em adultos de *Danio rerio* por meio da análise do biomarcador histológico de tecido nervoso, antes e após processo de recuperação biológica. Tal estudo objetivou contribuir com a interpretação de efeitos desencadeados por concentração representativa de corantes em efluentes têxteis, de modo a contribuir com estudos futuros de análise de risco, a partir da compreensão da relação concentração e efeito biológico, para gestão de corpos de água visando a proteção da vida aquática.

Realização

Apoio

METODOLOGIA

MANUTENÇÃO E CULTIVO DE *D. RERIO*

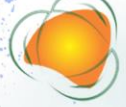
A cultura de *Danio rerio* foi mantida no Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histopatologias (LATHIS) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba – UNESP, seguindo-se as recomendações da norma ABNT NBR 15088 (2011). A água destinada ao cultivo e experimentos foi a de abastecimento previamente filtrada (filtros de carvão ativado) e desclorada. Os parâmetros pH, oxigênio dissolvido e dureza foram monitorados diariamente, para que fossem ajustados na faixa de 6,8 e 7; acima de 4mg/L⁻¹; 44mg/L⁻¹ ±2; respectivamente. A alimentação ministrada foi ração tetramim® com 97% de proteína bruta, “add libitum”, duas vezes ao dia. Os organismos foram mantidos em aquários de 20L em laboratório, na proporção de 1g de peixe por litro de água, mantidos em sala climatizada para temperatura (26°C ± 1°C) e fotoperíodo (12:12 luz – escuro).

Desenho experimental

O corante índigo blue sintético, padrão puro (pureza ≥ 98%) foi obtido da empresa Sigma-Aldrich, e o corante índigo natural (extraído da planta *Indigofera tinctoria*), foi doado pela empresa de tingimento natural Ai Ginska (São Paulo -SP). Ambos os corantes foram testados na concentração de 100 mg. L⁻¹, determinada com base na literatura, considerando-se a concentração média de corantes em efluentes têxteis (ALBUQUERQUE, 2009).

Os testes de toxicidade seguiram as recomendações de OECD (2010), adaptado para o biomarcador histológico tecido nervoso e foram realizados em aquários com capacidade para 3 litros, onde adicionou-se 2 litros de solução experimental de cada tratamento, sendo eles: índigo natural 100 mg. L⁻¹; índigo blue sintético 100 mg. L⁻¹ e Controle (água de cultivo). Em cada aquário adicionou-se 3 indivíduos adultos de *Danio rerio* (3 meses de idade) e para cada tratamento montou-se 4 réplicas, totalizando um N de

Realização



12 organismos-teste por condição experimental. A duração foi de 21 dias. Após esse tempo, 6 indivíduos de cada condição experimental foram aleatoriamente destinados à análise histológica. Os demais organismos (6 de cada condição experimental), foram destinados aos aquários contendo apenas água de cultivo, onde permaneceram mais 21 dias, em recuperação biológica, seguindo-se a análise histológica.

Histologia: análise qualitativa e semi-quantitativa

Os organismos-teste provenientes da exposição aos corantes e controle por 21 dias e os provenientes da recuperação biológica (21 dias de exposição aos corantes e mais 21 dias de recuperação biológica em água de cultivo), foram sacrificados utilizando-se o método de redução gradativa de temperatura, até 0 °C, e posterior inserção em fixador bouin, para as análises histológicas. seguindo-se as etapas de desidratação em seriação gradativa de álcool e xilol, inclusão em parafina, e cortes em micrótomo micron HM340E (4µm, com navalha de aço) para montagem de lâminas. A coloração utilizada foi Hematoxilina-Eosina. Os cortes histológicos foram observadas em microscópio óptico Axio Scope A1 e caracterizadas no *software* ZEN, priorizando-se a análise do tecido nervoso. A análise qualitativa foi baseada em: site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem – UNICAMP; Nervous System - National Toxicology Program; Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas - Wullimann et al. (1996).

Para a comparação dos resultados semi-quantitativos da histologia foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, utilizando-se o software Past 4.03, onde comparou-se a quantidade de alterações detectadas em cada indivíduo de cada condição experimental, considerando-se 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

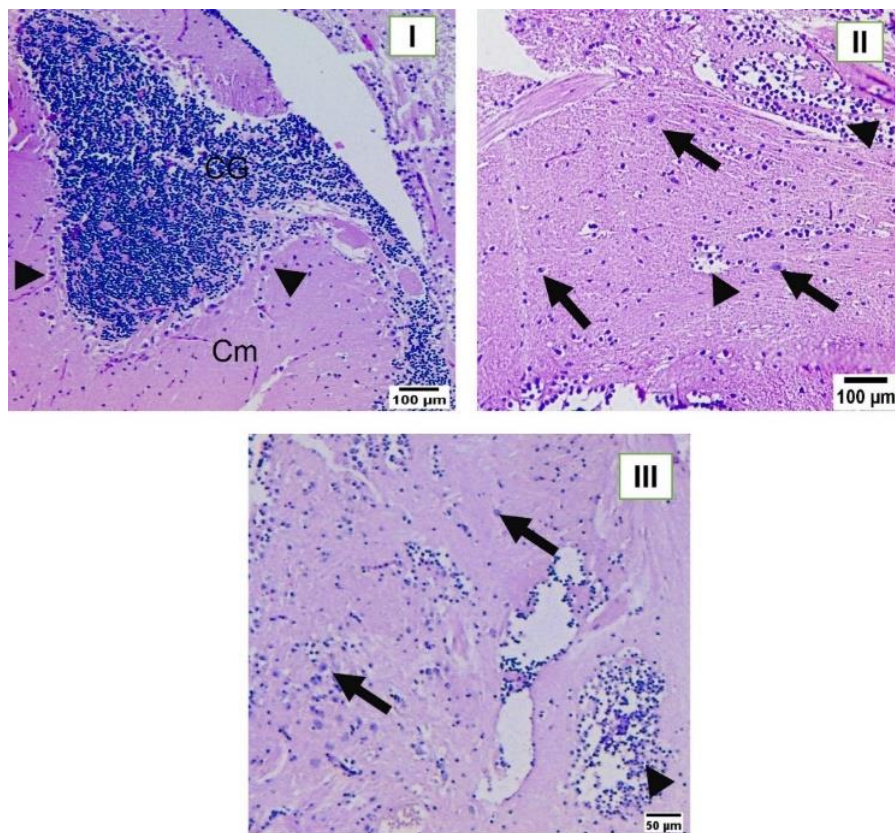
Controle

Normalmente, o cérebro do zebrafish possui conexões claras entre as composições do tecido nervoso, onde é possível identificar suas diferentes camadas. O exposto na figura 1 apresenta a região do córtex cerebelar que é subdividido em três camadas, a camada molecular, que contém poucos neurônios, mas é abundante em prolongamentos de

Realização

Apoio

neurônios e sinapses. No contexto histológico, essa camada é dada como rósea e pouco granulosa, possuindo uma proporção equilibrada na distribuição das células dessa região granulada. A segunda camada, é a camada das Células de Purkinje, que representa a via de saída do córtex cerebelar. Sua característica é seu núcleo grande, possuindo cromatina granulosa e nucléolo aparente. A terceira e última camada é granulosa, que se difere das outras na volumosa presença de núcleos, além de possuir neurônios (Células de Golgi). Assim, identifica-se pela irregularidade das células e pouco espaçadas.



Legenda I. Cm – Camada Molecular; CG – Camada Granulosa; Ponta de seta (▶) – Células de Purkinje.
Legenda II e III. Setas (→) – Neurônio saudável na camada molecular. Ponta de seta (▶) - Células granulares.

Figura 1 - Imagens histológicas do tecido nervoso de adultos de *D. rerio* do grupo controle (sem exposição aos corantes). I - Aumento de 10x; II - Aumento de 10x. III – Aumento de 5x.

Índigo blue sintético

Realização



Os quadros da figura 2 representam a histologia do tecido nervoso dos organismos que foram expostos à 100 mg. L⁻¹ do índigo blue sintético por 21 dias. Ao comparar a qualidade do tecido nervoso exposto ao corante com o grupo controle (Figura 1), pode-se perceber uma significativa diferenciação na própria textura da estrutura tecidual, padrão que acompanha a grande maioria dos organismos expostos, dado como a alteração do tecido. Além disso, identificou-se a degeneração da camada das células de Purkinje. As setas indicam a degeneração neural e a excessiva vacuolização dos neurônios, enquanto a ponta de seta evidencia a deformação de neurônios e das células gliais. Em 2-B, é possível identificar através das setas, a presença de morte celular, e a excessiva vacuolização, indicado pelas pontas de setas.

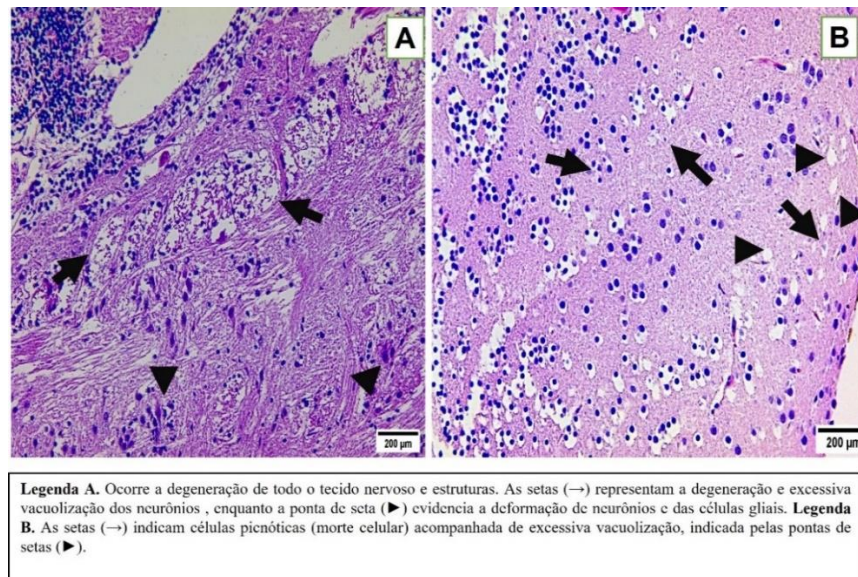


Figura 2 - Imagens histológicas do tecido nervoso de *D. rerio* expostos 21 dias ao corante Índigo blue sintético. A- Aumento de 20x; B - Aumento de 20x.

Recuperação biológica Índigo Blue sintético

Na figura 3 é exibido a histologia dos organismos que passaram pelo período de recuperação biológica, em condições ambientais similares ao controle, por 21 dias. Em 3-C, as setas exibem uma severa vacuolização e degeneração do tecido nervoso, enquanto a região amarela quadriculada apresenta células significativamente deformadas e o volume reduzido mais à esquerda da área indicada. Em 3-D, as setas indicam um extremo estriamento e necrose do tecido, com ocorrências de células picnóticas, excessiva

vacuolização e deformação celular.

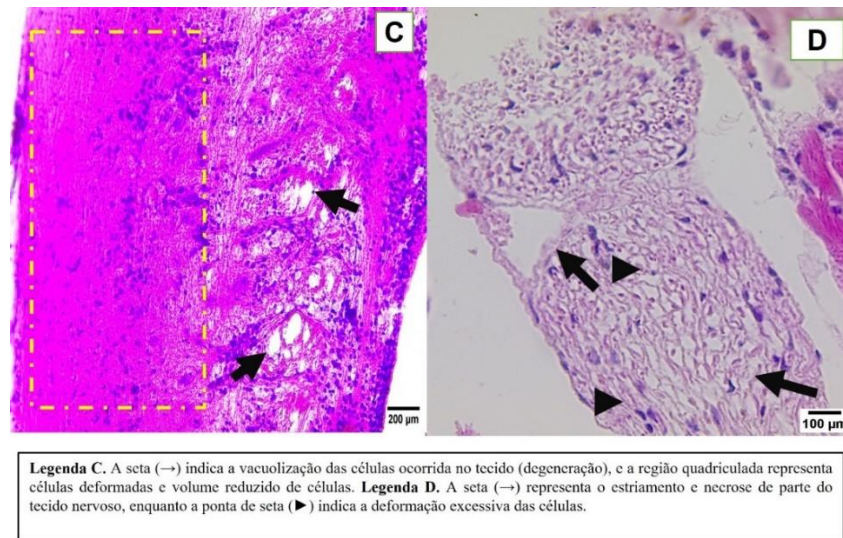


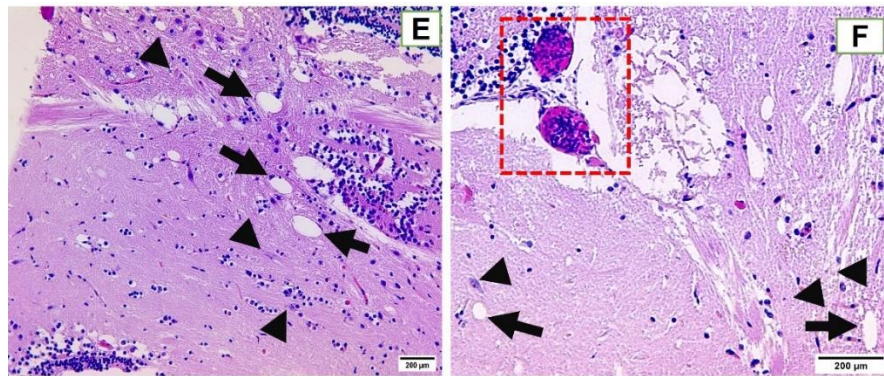
Figura 3 – Imagens histológicas do tecido nervoso de adultos de *D. rerio* após 21 dias de recuperação biológica dos organismos expostos ao índigo blue sintético. C - Aumento de 20x; D - Aumento de 10x.

Índigo blue natural

As mesmas condições experimentais da estrutura de contaminação com o índigo blue sintético foram dadas ao desenho experimental de exposição ao índigo blue natural. Nesse sentido, a figura 4 expõe os tecidos histológicos dos organismos-testes expostos ao índigo blue natural, enquanto a figura 5 evidencia a histologia dos indivíduos da recuperação biológica.

Na figura 4-E há uma manifesta vacuolização (seta) e neurônios necróticos (ponta de seta). Além disso, verifica-se o estriamento do tecido. Em 4-F percebe-se um grave enrijecimento do tecido, bem como a reincidência de vacuolizações e de neurônios necróticos (seta), enquanto a região em vermelho revela uma congestão e proliferação desordenada de células (neoplasia), somado à necrose do próprio tecido bem ao lado direito da região indicada e à diminuição visual do número de células, bem como neurônios picnóticos.

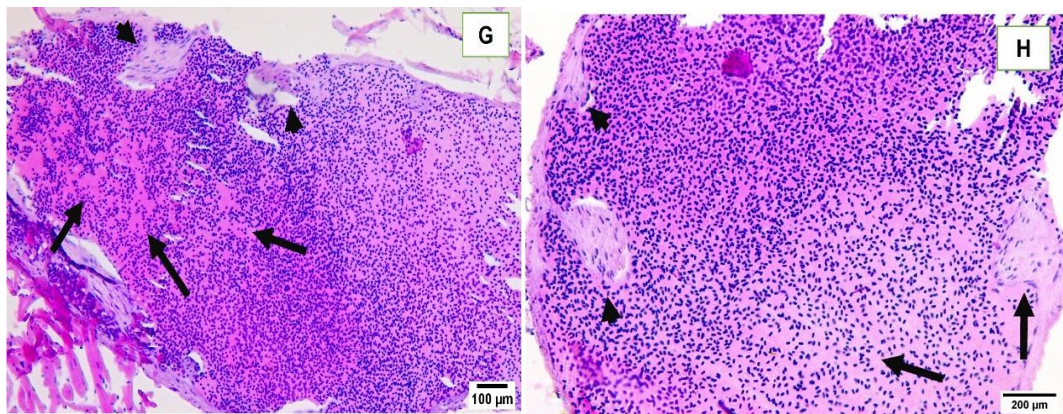
Realização



Legenda E. Degeneração de células representadas pelas vacuolização recorrente indicadas pelas setas (→) e presença de neurônios necróticos (▶). **Legenda F.** Vacuolização indicadas pelas setas (→) e neurônios em degeneração pelas pontas de setas (▶). A região quadriculada apresenta congestão e proliferação desordenada de células (neoplasia).

Figura 4 - Imagens histológicas do tecido nervoso de *D. rerio* expostos 21 dias ao corante Índigo blue natural. E- Aumento de 20x; F - Aumento de 20x.

Em ambas as figuras a seguir, (5-G e 5-H) é possível identificar regiões com evidente degeneração celular (seta), além de outras regiões mais clarificadas, com células diferenciadas e deformadas (ponta de seta), compreendendo uma grande desmielinização.



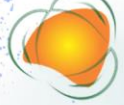
Legenda G e H. Evidências de degeneração celular indicadas pelas (→) além de regiões clarificadas e com células deformadas, indicando desmielinização (▶).

Figura 5 - Imagens histológicas do tecido nervoso de adultos de *D. rerio* após 21 dias de recuperação biológica dos organismos expostos ao índigo blue natural. G - Aumento de 10x; H - Aumento de 20x.

Em relação a análise semi-quantitativa, o número de alterações foi

Realização

Apoio



significativamente maior do que no controle tanto para o corante índigo blue sintético quanto para o índigo blue natural. O número de alterações observadas após tempo de recuperação biológica não diferiu em relação aos tratamentos com os respectivos corantes, indicando a não recuperação biológica (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de organismos avaliados em cada condição experimental e controle, indicando o número de organismos alterados histologicamente e a quantidade de alterações por indivíduos expostos

*Experimento	**Organismos analisados	Quantidade de organismos que apresentaram pelo menos uma das alterações descritas	% de organismos alterados	Quantidade de alterações por organismo	Somatória de alterações encontradas considerando-se todos os indivíduos analisados
Controle	8	0	0%	-	0
B	5	3	60%	B1: 8 B2: 5 B3: 5	18
BR	3	2	67%	BR1: 7 BR2: 6	13
N	7	5	71%	N1: 6 N2: 4 N3: 2 N4: 1 N5: 1	14
RN	5	4	80%	RN1: 1 RN2: 1 RN3: 1 RN4: 1	4
TOTAL	28	14			49

* B - Índigo blue sintético; BR - Recuperação biológica do índigo blue sintético; N - índigo Blue Natural; RN - Recuperação

Enquanto a análise qualitativa representa os efeitos que as concentrações desencadeiam, as análises quantitativas indicam o quanto essas alterações são representativas de risco ambiental, pois dão significância as alterações detectadas. Dessa maneira, esses estudos desempenham um importante papel na compreensão da atividade dos poluentes que são inseridos nos ecossistemas e, portanto, servindo como base para a gestão de risco à biota.

Assim, o presente estudo foi capaz de evidenciar o efeito tóxico dos corantes índigo blue sintético e natural sobre o tecido nervoso do organismo-teste *Danio rerio*, nas

Realização



condições do teste crônico. A concentração testada foi suficiente para causar diversas alterações histológicas, sendo que as mais frequentemente observadas, consistiram na degeneração do tecido nervoso e de neurônios, na excessiva vacuolização e diminuição das células presentes no tecido e células em processo de morte celular, indicando o comprometimento do tecido e a viabilidade do indivíduo a longo prazo.

O estudo também evidenciou a degeneração dos neurônios e do tecido como um todo após a exposição crônica ao corante por 21 dias. Resultados similares aparecem no estudo de VIDYA (2018), que comprovou a neuro degeneração leve do peixe *Oreochromis mossambicus* (Tilápia-de-Moçambique) após exposição de 96h à 12 mg.L⁻¹ de nanopartículas de Sílica (SiO₂NPs), bem como a neuro degeneração severa após expor esses mesmos organismos às mesmas concentrações por um período de 60 dias. Essas, por sua vez, são equiparáveis aos resultados encontrados na avaliação da recuperação biológica do presente estudo de ambas as situações experimentais, onde a degeneração se apresenta mais intensa qualitativamente do que os organismos expostos ao corante no teste crônico, comprovando que além de não ter ocorrido a recuperação do tecido nervoso após 21 dias em situações similares ao grupo controle, o decorrer do tempo apenas intensificou os efeitos da neuro degeneração de *D. rerio*.

CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, portanto, que os corantes índigo blue sintético e natural, na concentração de 100mg.L⁻¹ foram capazes de desencadear alterações histológicas no tecido nervoso de *Danio rerio*, em 21 dias de exposição, e que por igual período, em experimentos de recuperação biológica, não foi tempo suficiente para reverter os danos instaurados. Esses resultados indicam a fragilidade dos ambientes aquáticos receptores de efluentes contendo o corante índigo e alertam para a necessidade de análise de risco e determinação de uma concentração segura de exposição da biota ao referido corante.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – ICTS UNESP;

Realização

Apoio

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo no. 2018/05650-7, pelo recurso financeiro que viabilizou a presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, Edna et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 818-824, Oct. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 de abril. 2020.

ARCHELA, Edison; CARRARO, Adalberto; FERNANDES, Fernando; BARROS, Omar Neto Fernandes; ARCHELA, Rosely Sampaio. Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. **Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos**, Revista GEOGRAFIA, v. 12, ed. 1, p. 517-525, 2003. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/geografia/article/view/6711/6055>. Acesso em: 3 de abril. 2020.

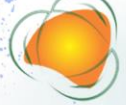
DA SILVA, João Paulo Sousa et al. Carvão ativado oriundo do mesocarpo do fruto da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) na remoção de corante em meio aquoso. Carvão ativado oriundo do mesocarpo do fruto da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) na remoção de corante em meio aquoso, argem Grande Paulista - SP, Brasil, ano 2021, v. 10, n. 21710313221, ed. 3, p. 2-24, 2021. DOI <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13221>. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Joao-Nobre-5/publication/350071034_Activated_coal_from_the_mesocarp_of_cashew_nuts_Anacardium_occidentale_in_the_removal_of_dye_in_water/links/604f5cdb92851c2b23cdc9d2/Activated-coal-from-the-mesocarp-of-cashew-nuts-Anacardium-occidentale-in-the-removal-of-dye-in-water.pdf. Acesso em: 26 abr. 2021.

GUARATINI, Cláudia C. I.; ZANONI, Maria Valnice B. Corantes têxteis. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 71-78, fev. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000100013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 de Abril. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000100013>.

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

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (USA). National Toxicology Program. Nervous System: Brain. In: LITTLE, Peter; RAO, Deepa B. Nervous System: Brain. <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/nervous/index.htm>, 2014. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/nervous/brain/index.htm>. Acesso em: 1 abr. 2021.

Realização



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (FCM-UNICAMP) (Brasil). Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas. Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem. In: QUEIROZ, Luciano S.; PAES, Rogério Augusto. Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/neupimportal.html>. Acesso em: 1 abr. 2021.

VIDYA, P. V. Irreversible Nanotoxicity of Silicon Dioxide Nanoparticles in the Freshwater Fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852). *Asian Fisheries Science*, [S. l.], v. 31, n. 2, 2018. DOI: 10.33997/j.afs.2018.31.2.006.

Realização



Apoio

