

## Avaliação da toxicidade e determinação de um critério de qualidade da água para proteção da vida aquática para o corante natural alizarina

Palavras-Chave: Ecotoxicologia, Organismos aquáticos, Antraquinona.

Autores(as):

Amanda Rocha Rodrigues, FT - UNICAMP

Adria Caloto de Oliveira, FT - UNICAMP

Gabriela Cristina Fonseca Almeida, FT - UNICAMP

Natalia Oliveira de Farias, FT - UNICAMP

Anjaina Fernandes de Albuquerque, FT - UNICAMP

Marina Tenório Botelho, FT - UNICAMP

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisela de Aragão Umbuzeiro (orientadora), FT - UNICAMP

### INTRODUÇÃO:

O corante alizarina (1,2-dihidroxi-antraquinona) é uma antraquinona usualmente extraída da planta *Rubia tinctorum*. Dessa planta também é possível extrair o *madder*, um corante amplamente utilizado no tingimento de tecidos, que possui majoritariamente alizarina em sua composição<sup>[1]</sup>. Portanto, a alizarina pode atingir o ecossistema aquático através do lançamento dos efluentes das indústrias têxteis. A alizarina apresentou toxicidade aguda para planta aquática *Lemna gibba*<sup>[2]</sup>, para fitoplâncton<sup>[3]</sup> e para o peixe *Danio rerio*<sup>[4]</sup>. Dessa forma, é importante complementar informações sobre os efeitos adversos que a alizarina pode causar em diferentes organismos, incluindo a resposta após exposição a diferentes condições de luz, tendo em vista que no ambiente aquático, a reação de fotossensibilização das antraquinonas pode gerar espécies reativas de oxigênio<sup>[5]</sup>. Diante disso, o presente projeto teve como objetivo avaliar a toxicidade da alizarina para a alga *Raphidocelis subcapitata*, para o microcrustáceo de água doce *Daphnia similis*, o anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis* e o peixe de água doce *Danio rerio*. Com esses resultados, foi possível estabelecer um Critério de Qualidade da Água para Proteção da Vida Aquática (CQA) para a alizarina, que é um limite no qual concentrações inferiores a ele não causarão efeitos adversos aos organismos aquáticos. Por fim, verificou-se a toxicidade fotoinduzida da alizarina utilizando ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* em diferentes condições de fotoperíodo.

### METODOLOGIA:

#### 1. Amostra-teste

A alizarina (CAS number: 72-48-0, 97,1% de pureza, Tokyo Chemical Industry, Figura 1) foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO), pois é um composto com baixa solubilidade em água. Em DMSO, a solubilidade da alizarina foi 1,93 g/L. Para a realização dos testes de toxicidade aguda é permitido que tenha, no máximo, 0,01% de DMSO nos meios de exposição<sup>[6]</sup>. Portanto, a máxima concentração de alizarina nos testes de toxicidade aguda foi definida como 193 µg/L.

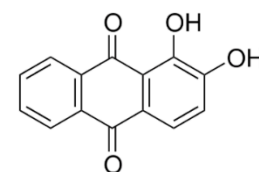


Figura 1. Estrutura química da alizarina

#### 2. Testes de toxicidade

Todos os organismos utilizados para os testes de toxicidade são cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG), localizado na Faculdade de Tecnologia (FT) da Unicamp. Foi realizado teste de toxicidade crônica com *R. subcapitata* e testes de toxicidade aguda com *D. similis*, *P. hawaiiensis* e *D. rerio*. A Tabela 1 apresenta os protocolos utilizados para cada organismo bem como as especificações para a realização dos ensaios. Para os testes com *R. subcapitata*, *D. similis* e *D. rerio* foram utilizadas as seguintes concentrações de alizarina: 12,1; 24,1; 48,3; 96,5 e 193 µg/L. Para o teste com *D. rerio*, utilizou-se as seguintes concentrações: 4,7; 9,4; 12; 18,8; 24; 35; 45; 48; 60; 75; 96; 100 e 193 µg/L.

Tabela 1. Especificações das metodologias dos testes de toxicidade

Organismo	Exposição	Controles	Método	Protocolo
<i>R. subcapitata</i>	72 h, 24 ± 2°C, luz e agitação contínuas	Positivo: carta-controle com NaCl Solvente: DMSO 0,01%	O teste foi feito em Erlenmeyer onde foi colocado o meio de cultivo da alga, a alizarina e a biomassa algal (1x10 <sup>4</sup> cél/mL). Foram feitas 3 replicatas por concentração.	OECD 201 <sup>[7]</sup>
<i>D. similis</i>	48 h, 22 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h luz:8 h escuro	Positivo: carta-controle com NaCl Solvente: DMSO 0,01%	O teste foi realizado em tubos de ensaio com 5 neonatos (6 – 24 h) em cada tubo. Foram feitas 4 replicatas por concentração.	ABNT 12.713 <sup>[8]</sup>
<i>P. hawaiiensis</i>	96 h, 24 ± 2°C com fotoperíodo de 12 h luz:12 h escuro	Positivo: carta-controle com Zn Solvente: DMSO 0,01%	O teste foi realizado em microplacas de 96 poços sendo que em cada poço foi colocado 1 neonato (≤ 7 dias). Foram realizadas 24 replicatas por concentração.	Artal <i>et al.</i> , 2018 <sup>[9]</sup>
<i>D. rerio</i> *	168 h, 26 ± 1°C com fotoperíodo de 12 h luz:12 h escuro	Positivo: 4 mg/L de 3,4-dicloroanilina Solvente: DMSO 0,01%	O teste foi realizado em microplacas de 24 poços e, em cada poço, foi colocado 1 embrião (coletado imediatamente após a fertilização). Foram feitas 20 replicatas por concentração.	OECD 236 <sup>[10]</sup>

\* O estudo com os embriões de *D. rerio* foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (protocolo nº 5645-1/2020).

Ao final do teste com *R. subcapitata*, mediu-se a inibição do crescimento a partir de uma correlação entre o número de células com a absorbância, medida por um espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 440 nm. Para a análise estatística, esses dados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, indicando que eles são não paramétricos. Portanto, para verificar a existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann-Whitney. Se observado diferenças significativas, calculou-se a concentração de inibição 50% (CI<sub>50</sub>), isto é, a concentração responsável por inibir o crescimento de 50% dos organismos.

Para *D. similis* foi observado a imobilidade para, então, calcular uma concentração de efeito 50% (CE<sub>50</sub>). Para *P. hawaiiensis* e *D. rerio* observou-se a mortalidade e, portanto, calculou-se a concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>). Para os cálculos da CI<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> utilizou-se regressão logística a partir do modelo de ajuste `drc()` que é uma função do pacote `drc()` disponível no software RStudio.

### 3. Cálculo do Critério de Qualidade da Água para Proteção da Vida Aquática (CQA)

O cálculo do CQA foi feito de acordo com as diretrizes europeias<sup>[11]</sup>, levando em considerando o valor mais sensível dentre os CI<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> obtidos nesse trabalho. A esse valor foi necessário aplicar um fator de avaliação (FA) que pode variar de 10 a 1000. O fator de avaliação é aplicado para que as condições laboratoriais possam ser extrapoladas para as condições ambientais e é escolhido a partir dos dados que se tem disponível. Para esse estudo, serão considerados os valores de toxicidade obtidos para todos os organismos utilizados na pesquisa, ou seja, a CI<sub>50</sub> da *R. subcapitata*, CE<sub>50</sub> da *D. similis* e CL<sub>50</sub> da *P. hawaiiensis* e do *D. rerio*.

#### 4. Avaliação do efeito da luz na toxicidade da alizarina

Para a realização do teste agudo com *D. similis* utilizou-se mesma metodologia descrita no tópico 2, alterando-se apenas o fotoperíodo. Foram feitos dois testes, um mantido 48 h em luz constante e o outro 48 h no escuro. Para complementar o estudo, verificou-se a degradabilidade do corante no período de exposição. Para isso, foi realizada uma análise espectrofotométrica de uma solução de alizarina (193 µg/L) no meio MS. A absorbância foi medida com um espectrofotômetro UV-Vis. As soluções foram expostas seguindo as mesmas condições dos testes de toxicidade aguda: 48 h de luz constante, 16:8 h (claro: escuro) e 48 h de escuro. A absorbância foi medida em 3 momentos: 0 h do teste (antes de iniciar a exposição), 24 h e 48 h após a exposição. Como branco, foi utilizada uma amostra do meio MS que também ficou exposta nas mesmas condições de fotoperíodo durante as 48 h. Os gráficos de absorbância foram construídos usando o software RStudio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 1. Testes de toxicidade

A alizarina não inibiu o crescimento de *R. subcapitata* ( $CI_{50} > 193 \mu\text{g/L}$ ) e não causou letalidade a neonatos *P. hawaiiensis* ( $CL_{50} > 193 \mu\text{g/L}$ ). Três antraquinonas naturais com estruturas químicas semelhante à alizarina (dermocycin, dermorubin e emodin) também não inibiram o crescimento de *R. subcapitata* e não causaram letalidade a neonatos de *P. hawaiiensis*<sup>[12, 13]</sup>. Mesmo não observando letalidade aos neonatos de *P. hawaiiensis* foi possível observar o corante dentro dos organismos (Figura 2).

Para *D. similis*, a alizarina apresentou um  $CE_{50}$  de 90,3 µg/L após 48 h de exposição (Figura 3A), sendo possível observar o corante dentro do organismo (Figura 3B). Outras antraquinonas naturais também apresentaram toxicidade para *D. similis*: o madder apresentou um  $CE_{50}$  de 4400 µg/L<sup>[14]</sup>, o dermocycin um  $CE_{50}$  de 510 µg/L<sup>[12]</sup> e o emodin um  $CE_{50}$  de 130 µg/L<sup>[13]</sup>.

Para o *D. rerio*, a alizarina apresentou um  $CL_{50}$  de 45,8 µg/L após 168 h de exposição (Figura 4A). Além disso, foi possível observar curvatura anormal da cauda dos organismos a partir das 48 h de teste. Após 96 h, todas as concentrações a partir da concentração de 24,1 µg/L, apresentaram mais que 10% dos organismos vivos com curvatura anormal da cauda (Figura 4B). Após as 168 h de exposição foi possível calcular uma concentração de efeito 10% ( $CE_{10}$ ) de 20,8 µg/L para a curvatura anormal da cauda (Figura 4C). Os corantes dermocycin<sup>[12]</sup>, dermorubin<sup>[12]</sup> e o emodin<sup>[13]</sup> apresentam os seguintes  $CL_{50}$  para os embriões de peixe-zebra após 168 h de exposição: 2.440, > 1.000 e 25 µg/L, respectivamente. Portanto, em

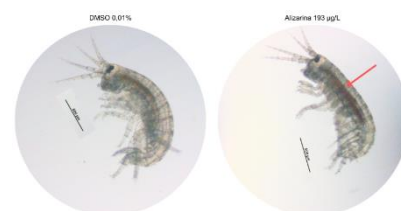


Figura 2. Comparação do trato digestório de neonatos de *Parhyale hawaiiensis* expostos a alizarina por 96 h. A seta vermelha indica o corante no organismo.

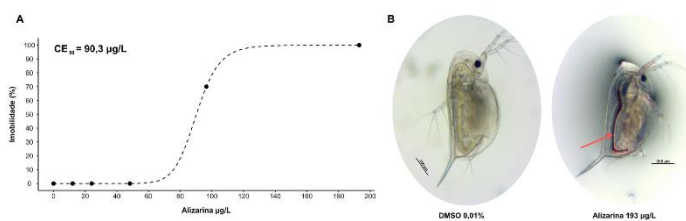


Figura 3. A: Curva de concentração x imobilidade e concentração de efeito 50% ( $CE_{50}$ ) para *Daphnia similis* após 48 h de exposição (n=20). B: Alizarina dentro do trato digestório da *D. similis*. A seta vermelha indica o corante.

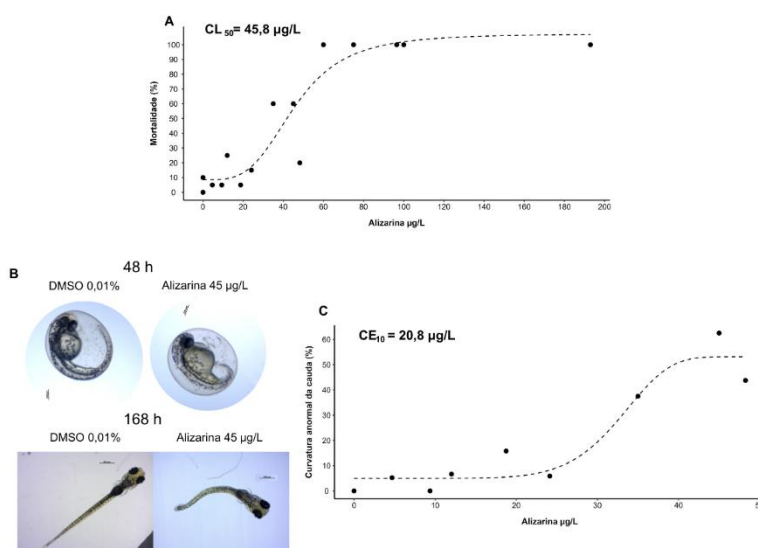


Figura 4. A: Curva de concentração x mortalidade e concentração letal 50% ( $CE_{50}$ ) para *Danio rerio* após 168 h de exposição (n=20). B: Embriões de *D. rerio* com curvatura anormal na cauda após 48 h e 168 h de exposição. C: Curva de concentração x curvatura anormal.

comparação com essas três antraquinonas naturais, o emodin foi mais tóxico que a alizarina para embriões de peixe zebra.

## 2. Cálculo do CQA

Para o cálculo do CQA escolheu-se um FA de 1000 pois há 3 valores de testes agudos para 3 níveis tróficos diferentes: alga, crustáceo e peixe<sup>[11]</sup>. O resultado do teste com *R. subcapitata* (CI<sub>50</sub>) foi considerado como um resultado de teste agudo, seguindo as diretrizes europeias<sup>[11]</sup>. Os embriões de *D. rerio* foram o organismo mais sensível, portanto, o valor de CL<sub>50</sub> de 45,8 µg/L foi dividido por 1000, obtendo um CQA de 0,046 µg/L. Isso significa que a alizarina não apresenta risco aos organismos aquáticos se estiver presente na água em concentrações abaixo de 0,046 µg/L.

## 3. Avaliação do efeito da luz na toxicidade da alizarina

Valores de CE<sub>50</sub> foram definidos para exposição a luz (105 µg/L) e escuro (68,6 µg/L) da *D. similis* à alizarina (Figura 5A). Na análise espectrofotométrica observou-se que antes da exposição a alizarina tinha picos de absorvância em 250 e 530 nm. Na literatura, foi reportado que a alizarina dissolvida em metanol possui picos de absorvância em 430 nm<sup>[15]</sup>. Como o metanol é um solvente polar, espera-se que ocorra um solvatocromismo negativo, que é quando o pico de absorvância de uma determinada substância desloca-se para um comprimento de onda menor devido ao meio em que está dissolvida<sup>[16]</sup>. Portanto, o pico de 530 nm é consistente com o valor da literatura. Depois de 48 h de exposição em luz constante (Figura 5B), os picos se deslocaram para 270 e 570 nm, indicando que o corante sofreu degradação. Na condição de 16:8 h (claro:escuro) (Figura 5C), observa-se um leve deslocamento seguindo o mesmo padrão que a exposição a luz constante. No escuro (Figura 5D), os picos da alizarina se mantiveram constantes ao longo das 48 h de exposição. É possível observar que há uma diminuição da toxicidade quando a exposição acontece em luz constante. Entretanto, em todas as condições testadas, a alizarina pode ser classificada como categoria 1 da toxicidade aquática do Global Harmonization System (GHS)<sup>[17]</sup>.

## CONCLUSÕES:

A alizarina não apresentou toxicidade crônica para *R. subcapitata* e aguda para *P. hawaiiensis*. Para *D. similis* e *D. rerio*, a alizarina apresentou CE<sub>50</sub>/CL<sub>50</sub> de 90,3 µg/L de 45,8 µg/L, respectivamente. Com isso, foi possível calcular um CQA de 0,046 µg/L para o corante. Na avaliação do efeito da luz na toxicidade da alizarina, verificou-se que a composto possui a tendência de se degradar quando exposto a luz e, com isso, a toxicidade do composto tende a diminuir. Entretanto, mesmo com essa diminuição na toxicidade, a alizarina pode ser classificada na categoria 1 de toxicidade aquática do GHS. Conclui-se que este estudo contribuiu para melhor compreender o perigo da alizarina para o ambiente aquático. Considerando a importância da

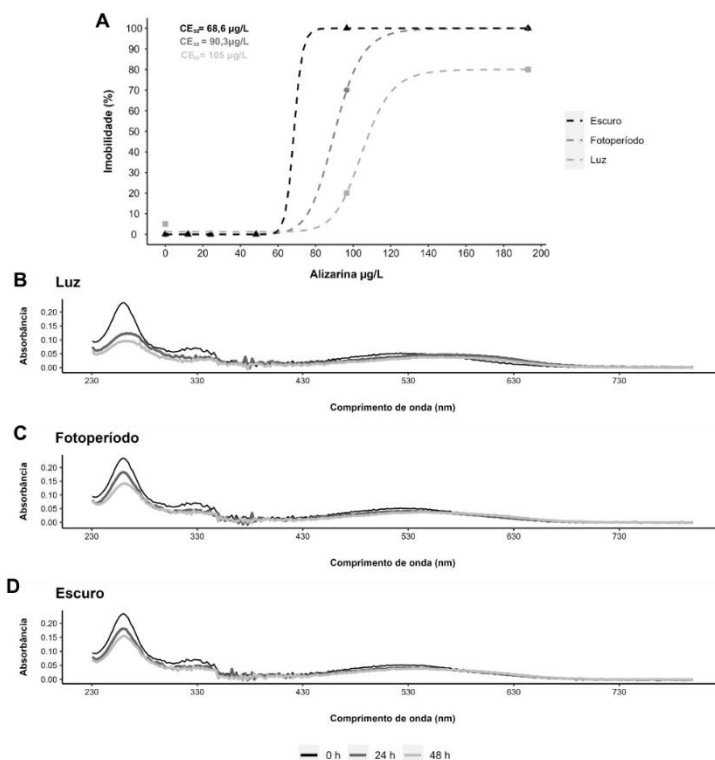


Figura 5. A: Curva concentração x imobilidade e concentração de efeito 50% (CE<sub>50</sub>) para *Daphnia similis* após 48 h de exposição no escuro, em fotoperíodo 16:8 h (claro:escuro) e luz constante. Espectro UV-Vis da solução de alizarina (193 µg/L) após exposição a luz.

alizarina como um corante para a indústria têxtil, esses dados podem ser usados posteriormente para a avaliação de risco deste composto.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] SANTIS, D. de; MORESI, M. Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 2, p. 151-162, 2007.
- [2] BABU, T. S. et al. Biochemical responses of the aquatic higher plant *Lemna gibba* to a mixture of copper and 1,2-dihydroxyanthraquinone: synergistic toxicity via reactive oxygen species. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 3030, 2005.
- [3] MARWOOD, C. A., et al. Photoinduced Toxicity to Lake Erie Phytoplankton Assemblages from Intact and Photomodified Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Journal of Great Lakes Research**, v.29, p.558-565, 2003.
- [4] KNECHT, A. L. et al. Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 271, n. 2, p. 266-275, set. 2013.
- [5] WANG, Y. et al. Experimental and theoretical studies on the photoinduced acute toxicity of a series of anthraquinone derivatives towards the water flea (*Daphnia magna*). **Dyes And Pigments**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 276-280, dez. 2009.
- [6] OECD. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23 (2nd edition). **Organisation for Economic Co-operation and Development**, v. 23, n. 23, p. 1-81, 2019.
- [7] OECD. Guidelines for the testing of chemicals: freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition test No. 201. Organisation for Economic Co-operation and Development, p.1-25, 2011.
- [8] ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de Ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Norma ABNT - NBR 12713, 5 ed., 38p, 2022. Rio de Janeiro, Brasil, 2022.
- [9] ARTAL, M. C. et al. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103-108, 2018.
- [10] OECD. Guidelines for the testing of chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test No. 236. Organisation for Economic Co-operation and Development, p. 1-22, 2013.
- [11] European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety, Technical guidance for deriving environmental quality standards, European Commission, 2017.
- [12] FARIAS, N. et al. Is natural better? An ecotoxicity study of anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 343, p. 140174, 2023.
- [13] FARIAS, N. de et al. The natural anthraquinone dye emodin: eco/genotoxicological characterization for aquatic organisms. **Food And Chemical Toxicology**, v. 189, p. 114749, 2024.
- [14] FREEMAN, H. S. *et al.* Molecular characterization and ecotoxicological evaluation of the natural dye madder and its chlorinated products. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 29, n. 16, p. 24261-24268, 2021.
- [15] JIANG, H. et al. Studies on the photofading of alizarin, the main component of madder. **Dyes And Pigments**, v. 185, p. 108940, fev. 2021.
- [16] HOMOCIANU, Mihaela. Exploring solvatochromism: a comprehensive analysis of research data. **Microchemical Journal**, p. 110166-110180, 2024.
- [17] United Nations Economic Commission for Europe (UNECE). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Rev. 10, 2023.