

## **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE COLORANTE MICROBIANO E SOLVENTES ALTERNATIVOS UTILIZANDO O ANFÍPODE MARINHO (*Parhyale hawaiiensis*)**

**Palavras-Chave:** TOXICIDADE AGUDA, INDIGOIDINA, SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

**Autores(as):**

**LUCAS DA SILVA DOMICIANO, FT – UNICAMP**

**BEATRIZ MIRABILI SANTANA, FCF – UNESP**

**Dr<sup>a</sup> AMANDA DOS SANTOS (coorientadora), FCF – UNESP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. VALÉRIA C. SANTOS-EBINUMA, FCF – UNESP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. GISELA DE ARAGÃO UMBUZEIRO (orientadora), FT - UNICAMP**

---

### **INTRODUÇÃO:**

O uso de colorantes (corantes e pigmentos) naturais ou sintéticos, para dar cor aos mais diversos objetos remonta a pré-história (TORRES et al., 2016). Durante o século XIX, os sintéticos se tornaram predominantes industrialmente, por conta da maior facilidade de aplicação e baixo custo (CARDON, 2010). Atualmente, sua atuação permeia indústrias de alimentos, cosméticos, couros, papéis, plásticos ou tecidos (BRUDZYŃSKA; SIONKOWSKA; GRISEL, 2021). Grande parte dos colorantes sintéticos são tóxicos para organismos aquáticos (BERRADI et al., 2019; FREEMAN et al., 2019). Com sua fabricação e uso em larga escala, os colorantes sintéticos têm permeado os ecossistemas e já foram detectados nos corpos hídricos (UMBUZEIRO et al., 2005; ARDILA-LEAL et al., 2021), sendo considerados contaminantes emergentes (RASHEED et al., 2019).

Em resposta a essa problemática, a busca por alternativas sustentáveis, como a produção verde de colorantes naturais, tem ganhado força (NAMBELA; HAULE; MGANI, 2019). No entanto, a toxicidade desses colorantes para organismos aquáticos também precisa ser avaliada, pois, embora tenham potencial para serem menos tóxicos que os sintéticos usados pelo mercado (WILLIAMS et al., 2022), alguns naturais apresentam toxicidade até superior que os sintéticos (FARIAS et al., 2023).

Além da busca por colorantes naturais mais sustentáveis, também vêm sendo investigados métodos de extração que não sejam prejudiciais para os ecossistemas aquáticos, como, por exemplo, a utilização de solventes verdes (ZHANG et al., 2012). Para ser classificado dessa forma, o solvente deve ser avaliado em três aspectos principais: ecotoxicidade, aspectos físico-químicos e toxicidade (LOMBA; ZURIAGA; GINER, 2019). Entre os mais promissores, estão os solventes eutéticos profundos (em inglês *deep eutetic solvents* - DES). Os DESs são substâncias líquidas à temperatura ambiente, obtidas a partir

da mistura de duas ou mais substâncias, cuja combinação resulta em um ponto de fusão menor ao de seus constituintes devido às ligações de hidrogênio (ELGHARBAWY et al., 2023).

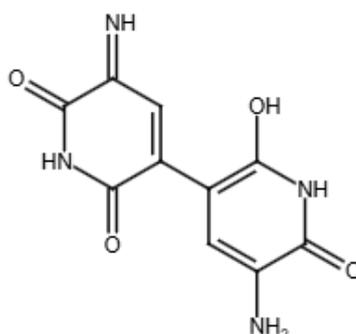
Assim, o objetivo deste projeto é avaliar a toxicidade da indigoidina, um corante natural azul, e de cinco DESs formados por mentol e ácidos orgânicos, empregados na extração de colorantes naturais, utilizando o anfípode *Parhyale hawaiiensis* como organismo-teste.

## METODOLOGIA:

### a. Colorante

A indigoidina (99,5% de pureza), foi obtida da empresa Shanghai Dekang Medical Technology Limited, Hong Kong.

Figura 1: Estrutura química da indigoidina.

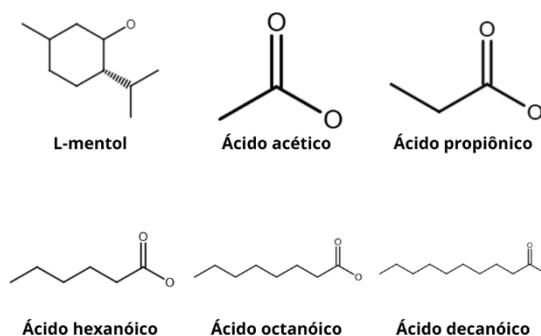


Fonte: Adaptado de PubChem.

### b. Solventes

Os DESs foram sintetizados e fornecidos pelo grupo de pesquisa Bioproducts' Production and Purification Lab (BioPPul), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araraquara, um parceiro estabelecido do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG). Cinco formulações diferentes foram analisadas neste estudo: L-mentol: Ácido acético, L-mentol: Ácido propiônico, L-mentol: Ácido hexanóico, L-mentol: Ácido octanóico e L-mentol: Ácido decanóico (Figura 2).

Figura 2: Estrutura química do L-mentol e dos ácidos orgânicos utilizados nas formulações dos solventes eutéticos.



Fonte: Autoria própria.

### c. Preparo de soluções

A indigoidina, devido à sua alta solubilidade, foi dissolvida no meio de cultura do organismo-teste (água do mar reconstituída, salinidade 30), e testada nas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>. Os solventes foram dissolvidos em água do mar reconstituída sob agitação constante, e testados em cinco concentrações cada um. Somente água do mar reconstituída foi utilizada como controle negativo.

### d. Teste de toxicidade aguda com *Parhyale hawaiiensis*

O teste de toxicidade aguda com o anfípode marinho *P. hawaiiensis* foi realizado de acordo com o método estabelecido por Artal et al. (2018). Para o ensaio, foram preparadas 5 concentrações, além do controle negativo. Em cada concentração, foram utilizados 24 neonatos ( $\leq 7$  dias), obtidos de mães com 8 a 10 meses, distribuídos individualmente em poços contendo 200  $\mu$ L de solução. Os testes tiveram duração de 96 horas, com fotoperíodo de 12h de luz:12h de escuro e temperatura de  $24 \pm 2$  °C. Após o período de exposição, os poços foram observados em estereomicroscópio e o número de organismos mortos foi contado. Os testes foram considerados válidos quando a mortalidade no grupo controle foi inferior a 10%. Adicionalmente, foram realizados testes de sensibilidade periódicos com sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) como substância de referência para conferir a aceitabilidade da cultura (USEPA, 2001).

### e. Análise estatística

Para realizar a análise dos testes de toxicidade aguda com *P. hawaiiensis* foi utilizado o modelo logístico generalizado do pacote glmnet (FRIEDMAN et al., 2010), no software R (RSTUDIO TEAM, 2021), para cálculo da concentração letal para 50% dos organismos (CL50) e o intervalo de confiança de 95% (IC).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

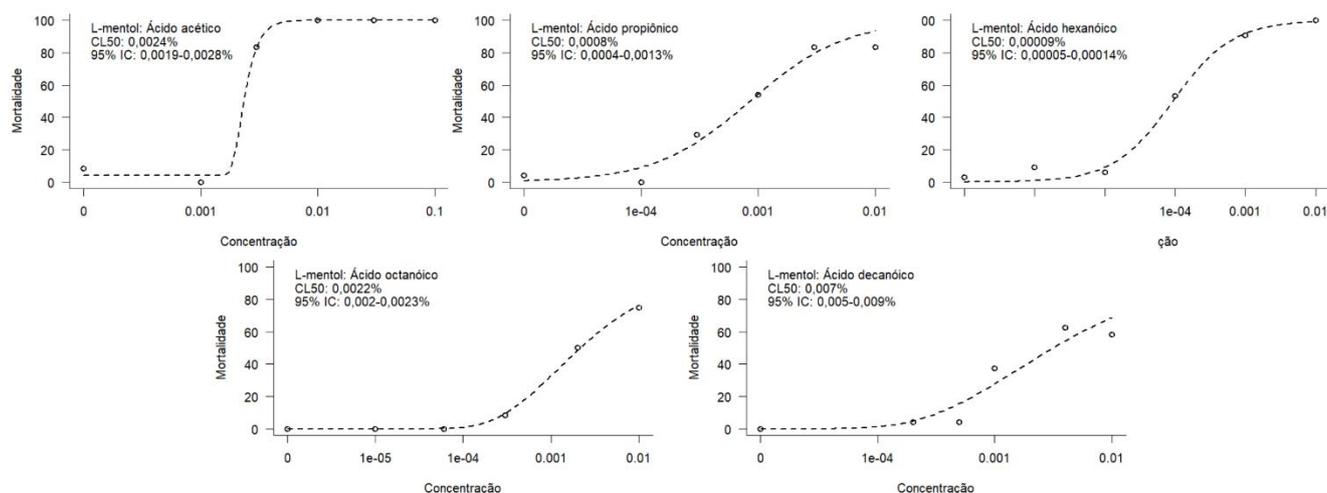
A indigoidina não apresentou toxicidade para *P. hawaiiensis* nas condições testadas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Teste de toxicidade aguda (96h) da indigoidina com *P. hawaiiensis*.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Mortalidade	
	Total	%
0	0	0
0,01	1	4,2
0,1	0	0
1,0	2	8,3
10	1	4,2
100	1	4,2

Fonte: Autoria própria.

**Figura 3:** Curvas concentração-resposta dos testes de toxicidade aguda (96h) para todos os DESs com *P. hawaiiensis*, incluindo suas respectivas concentrações letais de 50% (CL50) e intervalos de confiança de 95% (IC de 95%).



Fonte: Autoria própria.

O DES com menor CL50 foi a mistura de L-mentol e ácido hexanóico, com CL50 de 0,00009%, sendo considerado o mais tóxico entre os cinco testados. Para melhor compreensão sobre o efeito observado dos solventes, testes adicionais serão realizados usando os componentes individuais, ácidos e mentol separadamente. Além disso, serão realizadas triplicatas de cada teste para reforçar a robustez dos CL50 calculados.

## CONCLUSÕES:

A indigoidina não apresentou toxicidade para *P. hawaiiensis*, mostrando-se uma opção promissora como colorante sustentável. No entanto, é importante a realização de testes com outros organismos para confirmação desses resultados.

No caso dos solventes eutéticos profundos (DES), por todos apresentarem toxicidade para o organismo-teste, sua classificação como um solvente verde deve ser feita com cautela e reavaliada, incluindo testes de ecotoxicidade. Para compreender melhor a toxicidade observada, novos testes serão realizados com os componentes isoladamente, o que poderá auxiliar no desenvolvimento de outras formulações de DES.

---

## BIBLIOGRAFIA

- ARDILA-LEAL, L. D. et al. **A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases.** *Molecules*. MDPI AG, , 2 jun. 2021.
- 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, 15 mar. 2018.
- BERRADI, M. et al. **Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs.** *Heliyon*. Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.
- BRUDZYŃSKA, P.; SIONKOWSKA, A.; GRISEL, M. **Plant-derived colorants for food, cosmetic and textile industries: A review.** *Materials*. MDPI AG, , 1 jul. 2021.

- CARDON, D. Natural Dyes, Our Global Heritage of Colors. **Textile Society of America - 12th Biennial Symposium**, 2010.
- DE ARAGÃO UMBUZEIRO, G. et al. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, v. 60, n. 1, p. 55–64, 2005.
- ELGHARBAWY, A. A. M. et al. Menthol and Fatty Acid-Based Hydrophobic Deep Eutectic Solvents as Media for Enzyme Activation. **Processes**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2023.
- FARIAS, N. O. DE et al. Is natural better? An ecotoxicity study of anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 343, 1 dez. 2023.
- 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, 1 abr. 2022.
- FRIEDMAN, J.; HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. **Journal of Statistical Software**, v. 33, n. 1, p. 128–129, 30 jul. 2010.
- LOMBA, L.; ZURIAGA, E.; GINER, B. **Solvents derived from biomass and their potential as green solvents**. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. Elsevier B.V., , 1 ago. 2019.
- NAMBELA, L.; HAULE, L. V.; MGANI, Q. **A review on source, chemistry, green synthesis and application of textile colorants**. **Journal of Cleaner Production**. Elsevier Ltd, , 10 fev. 2020.
- OECD. **GUIDANCE DOCUMENT ON AQUEOUS-PHASE AQUATIC TOXICITY TESTING OF DIFFICULT TEST CHEMICALS**. Paris: OECD Publishing, v. 2, mar. 2019.
- RASHEED, T. et al. **Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment**. **Environment International**. Elsevier Ltd, , 1 jan. 2019.
- RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA: RStudio, PBC, 2021. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.
- TORRES, F. A. E. et al. **Natural colorants from filamentous fungi**. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Springer Verlag, , 1 mar. 2016.
- USEPA. 600/R-01/020: **Methods for Assessing the Chronic Toxicity of Marine and Estuarine Sediment-associated Contaminants with the Amphipod Leptocheirus Plumulosus, First Edition**. U. S. Environmental Protection Agency, 2001.
- WILLIAMS, T. N. et al. Metal-complexed monoazo dyes as sustainable permanent hair dye alternatives—Toxicological and durability properties. **Dyes and Pigments**, v. 197, 1 jan. 2022.
- XU, F.; GAGE, D.; ZHAN, J. Efficient production of indigoidine in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1149–1155, 24 ago. 2015.
- ZHANG, Q. et al. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7108–7146, 8 out. 2012.