



Avaliação da toxicidade de um corante natural azul utilizando embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*)

Palavras-Chave: *zebrafish*, indigoidina, corante natural, FET

Autoras:

Gabriela Bernardes de Carvalho Garcia, FT - UNICAMP

Profa. Dra. Amanda dos Santos (coorientadora), FT – UNICAMP

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (orientadora), FT - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Os colorantes, em sua maioria sintéticos, são amplamente utilizados em diversos setores da indústria, como na fabricação de fármacos, cosméticos e tecidos. A liberação de efluentes contendo esses compostos, sem tratamento adequado, pode causar impactos significativos à biota aquática, além de alterar a estética dos corpos hídricos, interferir na fotossíntese e comprometer a solubilidade dos gases dissolvidos na água (PINHEIRO, 2011). Diante desses impactos, cresce a busca por alternativas mais sustentáveis.

Os compostos de origem natural podem apresentar propriedades biológicas benéficas à saúde, fator que tem despertado a atenção de diversas indústrias (OLIVEIRA, 2023). Um exemplo é a indigoidina, um pigmento azul natural, de produção eficiente e conhecida por suas atividades antimicrobiana e antioxidante (YUMUSAK et al., 2019).

Embora sejam considerados ambientalmente mais seguros, os colorantes naturais nem sempre apresentam menor toxicidade quando comparados aos sintéticos, tornando necessária a avaliação dos potenciais efeitos adversos antes da comercialização (FARIAS et al., 2023).

Nesse contexto, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é bastante utilizado como modelo em ensaios toxicológicos por apresentar vantagens como rápido desenvolvimento embrionário, facilidade de cultivo e alta sensibilidade a substâncias químicas (MOURA; OLIVEIRA, 2014). Além disso, sua transparência óptica permite o monitoramento do desenvolvimento embrionário e facilita a identificação de alterações fenotípicas durante os testes (LOPES-FERREIRA, 2021). Com base nisso, este estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade do corante natural indigoidina, utilizando o ensaio Fish Embryo Toxicity (FET) com embriões de *Danio rerio*.

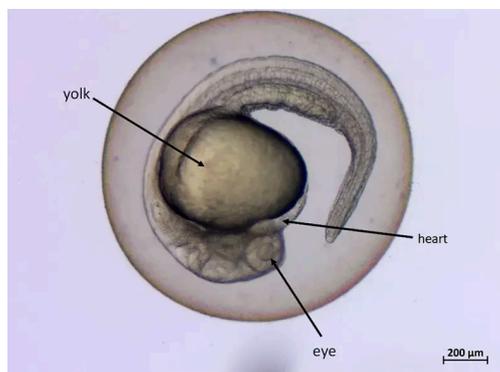
METODOLOGIA:

- **Colorante**

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

- **Organismo teste - embriões/larvas de *Danio rerio***

O biotério de peixe-zebra (*D. rerio*) está localizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) na Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas



(UNICAMP). Os peixes são criados em aquários com meio de cultivo composto por água deionizada proveniente do sistema de osmose reversa e sais. Os aquários são mantidos com temperatura de 26 ± 1 °C e fotoperíodos 12h (luz:escuro) controlados. Os parâmetros físico-químicos são monitorados três vezes na semana e devem seguir os seguintes valores: pH $7,0 \pm 0,5$; dureza 6,7 mg/L de CaCO_3 ; temperatura 26 ± 1 °C e condutividade 750 S/cm (OECD, 2013).

Figura 1: Imagem de um embrião de *Danio rerio* -
fonte: <https://consultqd.clevelandclinic.org/team-creates-novel-zebrafish-model-to-study-ewing-sarcoma>

- **Teste de embriotoxicidade com peixe-zebra (FET)**

Para obtenção dos embriões, aquários de desova foram preparados no dia anterior ao teste, com peixes machos e fêmeas na proporção de 2:1, separados por uma barreira e com bolinhas de gude no fundo para evitar a predação dos ovos, conforme a OECD nº 236 (OECD, 2013). Após a remoção da barreira e a fecundação, os peixes foram retirados, os ovos coletados com peneira, lavados com água reconstituída ISO e selecionados em estereomicroscópio, sendo descartados os não fertilizados ou com anomalias.

A água ISO é preparada no dia anterior e utilizada tanto na lavagem quanto no preparo das soluções dos colorantes. A indigoidina foi diluída diretamente em água. Foram testadas cinco concentrações para a indigoidina: 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L e 100 mg/L.

O teste foi conduzido em placas de 24 poços, com 20 embriões por concentração e 4 réplicas de controle interno (somente água reconstituída ISO). Cada poço recebeu 2 mL da solução e um embrião fertilizado. O teste foi incubado por 96 horas em câmara climatizada (27 ± 1 °C) com fotoperíodo de 12h (luz:escuro). Além disso, foi incluída também uma placa para o controle negativo (somente água reconstituída ISO) e uma para o controle positivo (3,4-DCA a 4 mg/L). Os testes são validados quando a mortalidade no controle negativo não exceder 10%. Além da mortalidade, foram observadas alterações fenotípicas: edema, alteração na cauda, absorção do saco vitelínico e alteração na bexiga natatória. Os parâmetros pH, condutividade e oxigênio dissolvido foram medidos no início e

ao final do teste. O estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP), sob o protocolo n° 6588, emitido em janeiro de 2025.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Não se observou mortalidade significativa em nenhuma concentração testada (Tabela 1). Outro teste será conduzido para confirmar os resultados obtidos. Nenhum efeito subletal significativo foi observado também.

Tabela 1. Testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações de indigoidina.	
Concentração (mg/L)	Mortalidade (%)
0,01	5
0,1	10
1	15
10	10
100	25
Controle negativo ^a	5
Controle positivo ^b	90

^aControle negativo, somente água reconstituída ISO, ^bControle positivo, 3,4-DCA a 4mg/L.

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos indicam que a indigoidina não foi tóxica para peixe-zebra, mostrando-se como uma alternativa promissora e mais sustentável em comparação a corantes sintéticos. No entanto, estudos adicionais, incluindo testes com outras espécies de diferentes níveis tróficos, são necessários para a consolidação de sua segurança para o ambiente aquático. Estes dados destacam a importância da avaliação da toxicidade de compostos naturais, mesmo sendo considerados mais seguros, corantes naturais também podem gerar toxicidade.

BIBLIOGRAFIA

OECD. (2013). Fish embryo toxicity test. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, (July), 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

YUMUSAK, C. et al. Biosynthesized Organic semiconductor. *Dyes and Pigments*, v. 171, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107768>>. Acesso em: 01 julho 2025

LOPES-FERREIRA, M. et al. O modelo Zebrafish e sua contribuição ao meio ambiente. Instituto Butantan, São Paulo, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.butantan.gov.br/bitstream/butantan/4453/1/978-65-86819-07-6-07.pdf>>. Acesso em: 29 julho 2025.

KOT, Anna M. et al. *Rhodotorula glutinis* — fonte potencial de lipídios, carotenóides e enzimas para uso nas indústrias. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 100, p. 6103-6117, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>>. Acesso em: 29 julho 2025.

MOURA, M. A. M.; OLIVEIRA, R. Uso de embriões de peixe-zebra em ecotoxicologia. Centro Experimental Central do Instituto Biológico. 2014. Disponível em: <<http://www.biológico.agricultura.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/uso-de-embri%C3%B5es-de-peixe-zebra-em-ecotoxicologia>>. Acesso em: 29 julho 2025.

OLIVEIRA, F. **Produção de colorantes naturais por *Talaromyces amestolkiae* para aplicação industrial**. Tese (99Doutorado em Biociência e Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/202312>>. Acesso em: 29 julho 2025.

OLIVEIRA, L. **Produção, estabilidade e aplicabilidade de colorantes produzidos por fungos filamentosos isolados de amostras de solo da Região Amazônica**. Tese (Doutorado em Biociência e Biotecnologia) - Rede BIONORTE, Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2023. Disponível em: <<https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/39491>>. Acesso em: 29 julho 2025.

SILVA, G. M. **Produção de biopigmentos pela levedura *Pichia kudriavzevii* cultivada em subprodutos agroindustriais**. 2020. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, University of São Paulo, Lorena, 2020. Disponível em: <[doi:10.11606/T.97.2020.tde-05082021-173845](https://doi.org/10.11606/T.97.2020.tde-05082021-173845)>. Acesso em: 29 julho 2025.

FARIAS, N. O. et al. Is natural better? An ecotoxicity study of anthraquinone dyes. **Chemosphere**, volume 343. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140174>>. Acesso em: 29 julho 2025.

ZACCARIM, B. R. et al. Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from amazon: A producer of natural colorants. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/btpr.2684>>. Acesso em: 29 julho 2025.